Tratado de Análises Clínicas

Editores

Luiz Fernando Barcelos

Jerolino Lopes Aquino

Editores Associados

Ana Lígia Bender

Humberto Façanha da Costa Filho

José Abol Corrêa

Lenilza Mattos Lima

Marcos Kneip Fleury

Mauren Isfer Anghebem

Paulo Murillo Neufeld

Pedro Alves d'Azevedo

SBAC
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

Atheneu

TRATADO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Editores

Luiz Fernando Barcelos | Jerolino Lopes Aquino

Editores Associados

Ana Lígia Bender | Humberto Façanha da Costa Filho

José Abol Corrêa | Lenilza Mattos Lima | Marcos Kneip Fleury

Mauren Isfer Anghebem | Paulo Murillo Neufeld | Pedro Alves d'Azevedo

SBAC
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

90 anos 1928•2018 Atheneu
nossa missão é construir o futuro

EDITORA ATHENEU

São Paulo — Rua Jesuíno Pascoal, 30
Tel.: (11) 2858-8750
Fax: (11) 2858-8766
E-mail: atheneu@atheneu.com.br

Rio de Janeiro — Rua Bambina, 74
Tel.: (21)3094-1295
Fax: (21)3094-1284
E-mail: atheneu@atheneu.com.br

Belo Horizonte — Rua Domingos Vieira, 319 — conj. 1.104

PRODUÇÃO EDITORIAL/CAPA: Equipe Atheneu
PROJETO GRÁFICO/DIAGRAMAÇÃO: Triall Composição Editorial Ltda.
ILUSTRAÇÕES: xxxxxx
CAPA: xxxxx

CIP-BRASIL. CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
SINDICATO NACIONAL DOS EDITORES DE LIVROS, RJ

T698

Tratado de análises clínicas / editores Luiz Fernando Barcelos, Jerolino Lopes Aquino. -
1. ed. - Rio de Janeiro : Atheneu, 2018.
: il.

Inclui bibliografia
ISBN 978-85-388-0887-9

1. Bioquímica clínica. 2. Toxicologia. I. Aquino, Jerolino Lopes.

18-49696

CDD: 612.015
CDU: 612.015

Meri Gleice Rodrigues de Souza - Bibliotecária CRB-7/6439
11/05/2018 16/05/2018

BARCELOS, L. F; AQUINO, J. L
Tratado de Análises Clínicas

© EDITORA ATHENEU
São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, 2018

Sobre os Editores

Luiz Fernando Barcelos

- Farmacêutico-Bioquímico. Especialização em Bioquímica Clínica na Keyo University, Tóquio - Japão;
- Especialização em Administração Hospitalar pelo Instituto de Administração Hospitalar e Ciências da Saúde (IAHCS);
- Título de Especialista em Análises Clínicas pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC);
- Professor de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS) 1974-1999;
- Professor de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da PUC-RS 1991-1999;
- Diretor Executivo da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) 2011-2016;
- Presidente da SBAC – Biênio 2017-2018;
- Assessor Científico do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ);
- Auditor do Programa de Acreditação de Laboratórios do Sistema Nacional de Acreditação (SNA/DICQ);
- Membro do Comitê Editorial da Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC).

Jerolino Lopes Aquino

- Professor Titular de Parasitologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) (aposentado);
- Farmacêutico Bioquímico pela Universidade Federal de Goiás (UFG);
- Especialista em Análises Clínicas pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC);
- Membro da Comissão Científica da SBAC, Área Parasitologia;
- Diretor-Presidente do Laboratório Carlos Chagas, Cuiabá - MT e do Conselho de Administração do Laboratório Cerba/LCA, São Paulo - SP.

Sobre os Editores Associados

Ana Lígia Bender

Farmacêutica-Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Mestre em Biociência pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS). Doutora em Medicina e Ciências da Saúde pela PUC-RS. Professora Adjunta e Coordenadora do Curso de Farmácia da Escola de Ciências da Saúde da PUC-RS. Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa em Imunodiagnóstico da PUC-RS.

Humberto Façanha da Costa Filho

Mestre em Administração pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Engenheiro Eletricista pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Engenheiro de Segurança pela Universidade de Passo Fundo (UPF). Especialista em Engenharia de Análise e Planejamento de Operação de Sistemas pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG/Eletrobras). Especialista em Engenharia de Segurança do Trabalho através do Instituto Argentino de Seguridade, Buenos Aires. Auditor Líder pelo Stat – Matrix – Institute/USA/HGB/BR. Engenheiro Superintendente da Companhia Estadual de Energia Elétrica (CEEE). Presidente da Fundação CEEE de Seguridade Social. Professor Titular da UPF. Professor do Centro de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (CEPAC) da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC). Professor do Instituto Cenecista de Ensino Superior de Santo Ângelo (IESA). Pós-Graduação em Análises Clínicas. Diretor do Laboratório Unidos – Passo Fundo. Diretor da Unidos Consultoria e Treinamento. Criador do Sistema de Gestão Custo Certo (SGCC) e do Programa de Proficiência em Gestão Laboratorial (PPGL).

José Abol Corrêa

Presidente do Conselho de Administração do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ). Diretor de Administração do PNCQ. Título de Especialista em Análises Clínicas pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC). Graduação como Farmacêutico-Bioquímico pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Estado do Pará (UFPA).

Lenilza Mattos Lima

Farmacêutica-Bioquímica pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Mestre em Farmácia na Área de Concentração e Análises Clínicas pela Universidade de São Paulo (USP). Professora Titular da Parasitologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde. Curso de Farmácia pela UFSC. Professora da Disciplina de Análises Clínicas do Curso de Odontologia da UFSC.

Marcos Kneip Fleury

Professor-Associado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Mauren Isfer Anghebem

Farmacêutica-Bioquímica. Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Professora Adjunta da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). Professora Adjunta do Departamento de Análises Clínicas da UFPR.

Paulo Murillo Neufeld

Professor Doutor e Chefe do Laboratório de Micologia Médica e Forense do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Pedro Alves d'Azevedo

Professor Titular do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Pós-Doutorado na Disciplina de Infectologia no Laboratório Especial de Microbiologia Clínica da Universidade Federal de São Paulo (LEMC-Unifesp). Dourado em Ciências (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Mestre em Farmacologia pela Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). Especialização em Análises Clínicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Graduado em Farmácia pela UFRGS.

Sobre os Colaboradores

Afonso Luís Barth

Farmacêutico-Bioquímico pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Doutor em Microbiologia Clínica pela Universidade de Londres. Professor Titular da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Farmacêutico-Bioquímico III do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HC-PA). Bolsista de Produtividade em Pesquisa 1B do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Coordenador do Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência aos Antimicrobianos (INPRA). Coordenador do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS).

Alceu de Oliveira Toledo Júnior

Farmacêutico-Bioquímico, Professor de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Alessandra Loureiro Morassutti

Bióloga, Mestre em Biologia Celular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Doutora em Zoologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS). Pós-Doutorado em Parasitologia pela The University of Nottingham, Inglaterra. Professora Adjunta de Parasitologia pela PUC-RS. Pesquisadora do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUC-RS no Laboratório de Parasitologia Molecular.

Alessandro Conrado de Oliveira Silveira

Farmacêutico-Bioquímico pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). Doutorado em Ciências Médicas pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Pós-Doutorado em Farmácia pela Universidade Federal de São Carlos (UFSC).

Alexandre Januário da Silva

Licenciatura em Ciências Biológicas. Mestre em Microbiologia (Especialidade Imunologia Diagnóstica em Parasitologia). Doutor em Microbiologia (Especialidade Diagnóstico e Biologia Molecular de Parasitas). Senior Biomedical Research Service Research Microbiologist/Lead Parasitologist pela Office of Applied Research and Safety Assessment/Center for Food Safety and Applied Nutrition - U.S. Food and Drug Administration.

Aline Borsato Hauser

Farmacêutica-Bioquímica. Professora do Laboratório Escola do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Amadeo Sáez-Alquézar

Farmacêutico-Bioquímico. Assessor Científico do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ). Consultor da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Ana Paula Duarte de Souza

Farmacêutica-Bioquímica pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Doutorado em Biologia Celular e Molecular pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS) com sanduíche na University of Melbourne, Austrália. Pós-Doutorado em Imunologia pela PUC-RS. Professora do Curso de Farmácia da Escola de Ciências da Saúde da PUC-RS. Professora Permanente de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança e do Programa Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica pela PUC-RS.

Angela Maria de Souza

Farmacêutica-Bioquímica formada pela Universidade Estadual do Ponta Grossa (UEPG), Paraná. Especialista em Hematologia Laboratorial pela UEPG. Mestre em Ciências Farmacêuticas – Insumos, Medicamentos e Correlatos pela Universidade Federal do Paraná (UFP). Doutoranda em Ciências Farmacêuticas – Insumos, Medicamentos e Correlatos pela UFP. Farmacêutica do Complexo Hospital de Clínicas da UFP com ênfase em Hematologia.

Carlos Augusto Albini

Professor Adjunto IV da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Especialista em Bacteriologia pela UFPR. Especialista em Metodologia Científica pela French-Canadian Heritage Society of California (FCHSC). Mestre em Educação pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Sócio Fundador do Núcleo de Bacteriologia Clínica de Curitiba (Nebac).

Carmen Paz Oplustil

Biomédica pela Universidade de Santo Amaro (UNISA). Mestre em Microbiologia pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Diretora da Formato Clínico Brasil e Chile.

Carolina De Marco Veríssimo

Bacharel em Biomedicina pelo Centro Universitário Metodista do Sul IPA – IPA. Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS). Pós-Doutorado em Biologia Celular e Molecular pela PUC-RS.

Cássia Maria Zoccoli

Farmacêutica Bioquímica. Diretora Técnica do Laboratório Médico Santa Luzia, Florianópolis - SC.

Catieli Gobetti Lindholz

Bacharel em Ciências Biológicas pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Mestre em Biologia Celular e Molecular pela PUCRS. Doutoranda em Zoologia pela PUCRS.

Célia Regina Garlipp

Farmacêutica-Bioquímica. Professora-associada da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

Cícero Armídio Gomes Dias

Doutor em Microbiologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Professor-Associado em Microbiologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Daniane Grando Remor Canali

Farmacêutica-Bioquímica. Gestora da Qualidade do Laboratório Médico Santa Luzia, Florianópolis - SC. Especialista em Interdisciplinaridade em Análises Clínicas pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). Auditora do Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos/Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (PALC/SBPC).

Elenice Messias do Nascimento Gonçalves

Biomédica pela Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo (UMC). Especialista em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP). Mestre em Parasitologia pelo Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Doutora em Patologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Encarregada do Laboratório de Parasitologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (DLC/HC-FMUSP). Coordenadora da Comissão Interna de Prevenção de Acidentes do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CIPA IC/HC-FMUSP).

Fabiane Gomes de Moraes Rego

Farmacêutica-Bioquímica. Professora de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Fernando Thomé Kreutz

Médico pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Doutor em Biotecnologia pela University of Alberta, Canadá. Professor Adjunto da Escola de Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS). Professor Permanente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica da PUC-RS. Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa em Imunodiagnóstico da PUC-RS. Pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) DT nível ID. Diretor do Grupo FK-Biotec.

Fernando Pretti

Professor (Aposentado) de Hematologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Sócio-Diretor do Laboratório Bioclínico, Vitória - ES. Membro da Sociedade Internacional de Hemostasia e Trombose (ISTH).

Flavia Valladão Thiesen

Farmacêutica Bioquímica. Professora da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS).

Flávio Naoum

Médico Hematologista. Residência em Hematologia e Hemoterapia pela Santa Casa de São Paulo (SCSP). Mestre em Hematologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Doutor em Medicina Interna pela Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Pós-Doutorado pela Middlesex University (Inglaterra). Diretor Clínico da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto. Coordenador do Instituto Naoum de Hematologia.

Geraldo Attilio de Carli

Farmacêutico Químico pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Mestre em Parasitologia e Doutor em Farmácia e Bioquímica pela UFRGS. Ex-Professor Titular do Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica do Instituto de Geriatria e Gerontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS). Ex-Professor Titular de

Parasitologia Clínica da Faculdade de Farmácia da PUC-RS. Ex-Professor Titular de Análises Parasitológicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Ex-Professor Titular de Parasitologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS). Ex-Pesquisador pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Ex-Bolsista da Universidade de Wisconsin, Madison, EUA. Ex-Bolsista do Centro Pan-Americano de Zoonoses da Oficina Sanitária Pan-Americana da Organização Pan-Americana da Saúde da Organização Mundial da Saúde (OPS/OMS), Buenos Aires, Argentina. Ex-Bolsista da Japan International Coorporation Agency (JICA) da Japanese Association of Parasite Control (JAPC). Ex-Bolsista da Deutscher Akademischer Austausch Diemst (DAAD) no Instituto de Medicina Tropical Bernhard Nocht, Hamburgo, Alemanha. Ex-Bolsista da Universidade de Kyorin, Tóquio, Japão.

Geraldo Picheth

Farmacêutico-Bioquímico. Professor de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Gisele Maria Buczenko Singer

Farmacêutica-Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Mestre em Tecnologia Química – Setor de Tecnologia Química – pela UFPR. Farmacêutica-Bioquímica do Setor de Hematologia, Hemostasia e Líquidos Cavitários do Complexo Hospital de Clínicas da UFPR. Preceptora da Residência Multiprofissional do Complexo Hospital de Clínicas.

Gustavo Pelicioli Riboldi

Farmacêutico-Bioquímico pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS). Mestrado e Doutorado em Biologia Celular e Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBCM, Centro de Biotecnologia - UFRGS). Pós-Doutorado em Metaloproteômica e Cristalografia de Proteínas (ICaMB, Newcastle University). Pesquisador do Structural Genomics Consortium da Universidade Estadual de Campinas (SGC/Unicamp).

Helena Aguilar Peres de Mello de Souza

Graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela UFPR. Farmacêutica pela UFPR, Seção de Bacteriologia do Hospital de Clínicas de Curitiba. Responsável Técnica da Newprov Produtos para Laboratórios Ltda. e Diretora do Núcleo de Estudos de Bacteriologia Clínica de Curitiba. Doutoranda em Medicina Interna e Ciências da Saúde pela UFPR.

Itacy Siqueira

Graduação em Biomedicina pela Universidade de Santo Amaro (Unisa). Coordenadora Técnica do Laboratório Clínico do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Possui experiência na Área de Microbiologia e Controle de Qualidade.

Jorge Sampaio

Professor de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

José Mauro Peralta

Médico pela Escola Médica do Rio de Janeiro da Universidade Gama Filho (UGF). Mestre em Microbiologia e Doutor em Ciências pela Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Pós-Doutorado no Centers for Disease Control e Georgia State University (EUA). Professor Titular do Departamento de Imunologia do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ.

Juliana Caierão

Farmacêutica-Bioquímica. Doutora em Ciências (Microbio-logia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Pós-Doutorado pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Professor Adjunto do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Júlio Cezar Merlin

Farmacêutico-Bioquímico. Doutor em Ciências da Saúde pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). Professor de Hematologia e Citologia Clínica na Escola de Ciências da Vida e Escola de Medicina da PUC-PR.

Karin Silva Caumo

Professora de Parasitologia Clínica. Doutora do Departamento de Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Lauro Santos Filho

Farmacêutico-Bioquímico pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Doutorado em Microbiologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Pós-doutorado no Hartford Hospital Health Center, Connecticut, EUA. Professor Titular de Microbiologia Clínica da UFPB.

Leandro Reus Rodrigues Perez

Doutorado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Microbiologista do Hospital Mãe de Deus.

Maitê Peres de Carvalho

Fisioterapeuta. Especialista na Área de Fisioterapia em Geriatria e Gerontologia. Doutora em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Rio Grande (UFRG). Pós-Doutoranda em Epidemiologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Mara Cristina Scheffer

Farmacêutica-Bioquímica do Setor de Microbiologia da Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Mestrado em Microbiologia pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Doutorado em Farmácia na Área de Microbiologia pela UFSC.

Marcelo Pilonetto

Doutor em Ciências da Saúde pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). Professor Adjunto de Microbiologia Médica pela PUC-PR. Microbiologista do Setor de Bacteriologia Molecular dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN/PR). Consultor do DB Medicina Diagnóstica.

Marcos E. de Almeida

Mestre e Doutor em Biologia Molecular pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Responsável pelo Diagnóstico de Leishmaniose no Centers for Disease Control and Provention – CDC, Atlanta, GA, EUA.

Marcos José Machado

Farmacêutico-Bioquímico. Professor-Associado IV da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Marileia Scartezini

Farmacêutica-Bioquímica. Professora de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Marilise Brittes Rott

Professora de Parasitologia. Doutora pelo Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Marinês Dalla Valle Martino

Doutorado em Medicina (Pediatria) pela Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSC-SP). Coordenadora Médica do Laboratório da Sociedade Beneficente Israelita Brasileira do Hospital Albert Einstein.

Nina Reiko Tobouti

Farmacêutica-Bioquímica. Gestora do Setor de Microbiologia do Laboratório Médico Santa Luzia, Florianópolis - SC. Especialista em Qualidade e Produtividade pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Orildo dos Santos Pereira

Farmacêutico-Bioquímico. Especialista em Citologia.

Patrícia Haas

Farmacêutica-Bioquímica. Professora de Citologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Paula Koga

Doutorado em Agronomia (Produção Vegetal) pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp).

Paula Virginia Bottini

Médica, Supervisora da Seção de Líquidos Biológicos da Divisão de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

Paulo Cesar Naoum

Professor Titular pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp). Diretor da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto.

Pedro Luis Colturato

Farmacêutico-Bioquímico. Especialista em Citologia Oncótica.

Pedro Peloso

Biólogo, Microbiologista Clínico, Mestre em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Gerente de Microbiologia Clínica do Laboratório Richet - RJ. Consultor de Microbiologia Clínica da Rede D'Or São Luiz - RJ. Consultor Líder da BIOMIC Consultoria em Microbiologia Clínica.

Rafael Bueno Orcy

Fisioterapeuta. Doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Professor Adjunto da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Regina Helena Saramago Peralta

Farmacêutica-Bioquímica pela Universidade Federal Fluminense (UFF). Mestre em Ciências pelo Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Doutora em Ciências pelo Instituto

de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ. Professora-Associada da Faculdade de Medicina da UFF.

Renata Russa Frasca Candido

Bióloga pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS). Mestrado em Zoologia pelo Programa de Pós-graduação em Zoologia da PUC-RS. Doutorado pelo Programa de Pós-Gradução em Biologia Celular e Molecular da PUC-RS, com período sanduíche no Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Austrália e The University of Western Australia, Perth, Austrália, sendo indicada ao prêmio Capes-Inerfarma de Inovação e Pesquisa 2015. Foi Bolsista de Pós-Doutorado Júnior com bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no Laboratório de Biologia Parasitária da PUC-RS e no Laboratório de Parasitologia Molecular no Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUC-RS. Pós-Doutorando pelo Programa PDE do CNPq na Universidade de Queensland, Brisbane, Austrália, com períodos intercalados na Escola de Física da UWA, Perth, Austrália. Tem experiência na Área de Parasitologia, com ênfase em Diagnóstico de Helmintíases Humanas.

Samuel Ricardo Comar

Farmacêutico-Bioquímico. Especialista em Hematologia e Líquidos Biológicos.

Sérgio Eduardo Fontoura da Silva

Farmacêutico-Bioquímico. Professor de Toxicologia da Escola de Saúde e Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR).

Sérgio Luiz Bach

Farmacêutico-Bioquímico. Professor da Faculdade Pequeno Príncipe da Universidade Tuiuti do Paraná (UTP) e Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Sérgio Monteiro de Almeida

Professor Adjunto do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Professor no Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Mestrado e Doutorado. Membro Titular da Academia Brasileira de Neurologia. Coordenador do Departamento Científico de Líquido Cefalorraquidiano da Academia Brasileira de Neurologia. Neurologista Especialista em Líquido Cefalorraquidiano do Laboratório de Virologia do Hospital das Clínicas (HC) da UFPR. Responsável pelo Ambulatório de Neuroinfecção HC-UFPR. Mestrado em Neurologia e Doutorado em Imunologia pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Pós-Doutorado no Setor de Neuroimunologia, Queen Square, Londres, Inglaterra. Pós-Doutorado pelo HIV Neurobehavior Research Center, UCSD, San Diego, EUA. Pesquisador Visitante, UCSD San Diego, EUA.

Silva Maria Spalding

Graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRJ). Graduação em Análises Clínicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Mestrado em Ciências Veterinárias pela UFRGS. Doutorado em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e MBA em Gestão de Hemocentros pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE e Ministério da Saúde). Professora-Associada da UFRGS. Técnica em Saúde e Ecologia Humana da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde da Secretaria da Saúde do Estado.

Thalita Martinelli

Médica pela Universidade Católica de Pelotas (UCPel). Residente em Medicina Interna pelo Hospital Universitário São Francisco de Paula, Pelotas - RS.

Tiana Tasca

Farmacêutica-Bioquímica em Análises Clínicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Mestre em Biociências, Área de Zoologia – Parasitologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS). Doutora em Ciências Biológicas – Bioquímica pela UFRGS, com Doutorado-sanduíche pela University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, EUA. Professora da Disciplina de Parasitologia Clínica do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Valter Teixeira Motta

Farmacêutico-Bioquímico. Professor de Bioquímica Clínica da Universidade de Caxias do Sul (UCS).

Vera Lucia Plagliusi Castilho

Doutorado em Medicina pela Universidade de São Paulo (USP). Médica Chefe do Laboratório de Parasitologia Clínica da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Médica Primeira Assistente do Laboratório de Patologia Clínica da Irmandade de Misericórdia de São Paulo. Responsável pelo Setor de Parasitologia e Sistema de Gestão e Controle de Qualidade.

Vlademir V. Cantarelli

Professor Adjunto da Universidade Feevale no Novo Hamburgo e da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS (UFCSPA). Consultor do Laboratório Qualitá em Novo Hamburgo, RS. Formado em Farmácia e Análises Clínicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Biomedicina pela Universidade Feevale. Doutorado (PhD) em Ciências Farmacêuticas na Área de Microbiologia pela Universidade de Osaka, Japão. Pós-Doutorado pela Universidade de Osaka, Japão. Consultor Internacional da American Society for Microbiology (ASM).

William Peres

Farmacêutico-Bioquímico. Doutor em Ciências Biológicas pela Universidad de León, Espanha.. Professor Adjunto do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Prefácio

Distinguem-me os colegas Luiz Fernando Barcelos e Jerolino Lopes Aquino, editores deste *Tratado de Análises Clínicas*, convidando-me para prefaciar esta obra. Faço-a, entre surpreso e honrado, porém entendo que a escolha vem de seu carinho especial e, talvez, pela homenagem que fazem a mim pelos anos vividos nessa seara maravilhosa do diagnóstico laboratorial. Seus editores, bem como os coordenadores e autores dos capítulos, devem sentir-se recompensados pela missão cumprida e, mais importante, terem contribuído com suas especialidades para enriquecer essa grande área do laboratório clínico.

É fora de dúvida a grande experiência e o longo trabalho de seus editores dedicado a essa área, cujos currículos demonstram atividades na área de ensino, professores que são, além de inúmeras outras exercidas como assessores ou consultores em diversos órgãos governamentais ou não. Saliento a grande experiência dos editores, junto à Sociedade Brasileira de Análises Clínicas/(SBAC), cuja Presidência foi exercida pelo Dr. Jerolino e, agora, pelo Dr. Barcelos. Suas atividades empresariais merecem ser destacadas, como o Laboratório Carlos Chagas, de Cuiabá, desde 1968, empreendimento pioneiro, de sucesso, do Dr. Jerolino e aquelas em Porto Alegre, exercidas pelo Dr. Barcelos em diversas empresas desde 1969.

Por isso, não era sem tempo que esta obra devesse ser editada, mormente quando se sabe que a medicina diagnóstica, no país, quase 82% dizem respeito às análises clínicas que, de outro modo, representam cerca de 16.600 unidades, segundo censo estatístico.

Penso que nada foi subestimado na obra se partirmos da premissa de que não se pode favorecer nesta área a nenhum dos capítulos pela própria importância que cabe a cada um deles. A criteriosa escolha de seus autores faz jus à excelência dos temas alinhados, bem como seu destaque, item por item.

Gostaria de salientar, pelo que representa para aqueles que desejam se iniciar na área do laboratório clínico, a preocupação dos editores em iniciar esta obra com temas básicos que devem e precisam ser pensados. As Partes 1 e 2 tratam da Gestão Administrativa e Financeira e Gestão da Qualidade. São dois capítulos que considero de extrema importância para aqueles que se dispõem a enfrentar as primeiras responsabilidades no laboratório diagnóstico, entendido este como uma empresa que, ao lado da preocupação de administrar e gerir seus destinos, tem a obrigação de atender à gestão da qualidade técnica, como preliminares do empreendimento. Desse claro pressuposto deve partir o pensamento e a definição do profissional para seguir adiante em sua missão de melhor atender o cliente e o médico que requisita o exame.

Fazer certo é a principal qualidade do laboratório para ser confiável, independentemente das novas tecnologias que exigem mudanças. Razões que me fazem dizer que um bom prognóstico traduz-se pelo bom resultado laboratorial e disto, imagino, uma decisão clínica desejada.

As razões deste Tratado não é, pois, outra, senão a de trazer ao profissional tudo o que precisa para informar-se melhor sobre os exames que compõem o quadro do diagnóstico laboratorial, bem como as doenças que importam ser conhecidas para o nexo devido.

Mesmo assim, é preciso não esquecer que nessa área do diagnóstico clínico o avanço da tecnologia é tão rápido que nos deixa e, certamente, seus autores, numa sensação de que esse cenário vai se modificando, à medida que crescem as exigências da medicina.

Mas é absolutamente válida a importância deste *Tratado de Análises Clínicas*, cuja preocupação maior de seus editores foi a de entregar aos profissionais que militam nesta seara o que de mais tradicional compõe seu universo, neste instante do conhecimento. E que abre ao leitor mais uma oportunidade para inteirar-se de seus domínios na área.

Faço votos que o livro alcance os seus objetivos e as expectativas de seus editores e autores.

José Carlos Barbério/Professor
Titular Aposentado da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Ex-Diretor do Setor de Radiofarmácia do IEA/IPEN
Diretor da Central de Radioimunoensaio de São Paulo/CRIESP/1973-2001

Sumário

Parte 1

Gestão Administrativa e Financeira 1

Humberto Façanha da Costa Filho

CAPÍTULO 1 Gestão Administrativa e Financeira 3
Humberto Façanha da Costa Filho

Parte 2

Gestão da Qualidade 11

Luiz Fernando Barcelos

CAPÍTULO 2 Gestão da Qualidade 13
Luiz Fernando Barcelos ▪ José Abol Corrêa

Parte 3

Bioquímica 33

Mauren Isfer Anghebem

CAPÍTULO 3 Desequilíbrio Acidobásico 35
Valter Teixeira da Motta

CAPÍTULO 4 Equilíbrio Hidreletrolítico 45
Valter Teixeira da Motta

CAPÍTULO 5 Diabetes *Mellitus* 55
Geraldo Picheth

CAPÍTULO 6 Dislipidemias 69
Marileia Scartezini

CAPÍTULO 7 Doenças Cardiovasculares 81
Alceu de Oliveira Toledo Júnior

CAPÍTULO 8 Pâncreas 89
Marcos José Machado

CAPÍTULO 9 Doenças Renais 99
Aline Borsato Hauser

CAPÍTULO 10 Endocrinologia Clínica e Diagnóstica 113
Fabiane Gomes de Moraes Rego

CAPÍTULO 11 Envelhecimento 127
William Peres ▪ Maitê Peres de Carvalho ▪ Thalita Martinelli ▪ Rafael Bueno Orcy

CAPÍTULO 12 Fígado, Enzimas e Proteínas Plasmáticas 141
Amadeo Sáez-Alquézar

Parte 4

Líquidos Biológicos 157
Mauren Isfer Anghebem

CAPÍTULO 13 Líquido Amniótico 159
Mauren Isfer Anghebem ▪ Júlio Cezar Merlin

CAPÍTULO 14 Líquido Cefalorraquidiano - LCR 167
Samuel Ricardo Comar ▪ Gisele Maria Buczenko Singer ▪ Mauren Isfer Anghebem
Angela Maria de Souza ▪ Sérgio Monteiro de Almeida

CAPÍTULO 15 Líquido Seminal 199
Orildo dos Santos Pereira

CAPÍTULO 16 Líquido Sinovial 213
Sérgio Luiz Bach

CAPÍTULO 17 Líquidos Cavitários ou Líquidos Serosos 221
Patrícia Haas ▪ Pedro Luis Colturato ▪ Samuel Ricardo Comar

CAPÍTULO 18 Urinálise 257
Célia Regina Garlipp ▪ Paula Virginia Bottini

Parte 5

Toxicologia 265
Mauren Isfer Anghebem

CAPÍTULO 19 Controle Toxicológico 267
Sérgio Eduardo Fontoura da Silva

CAPÍTULO 20 Monitoramento Terapêutico 277
Flavia Valladão Thiesen

Parte 6

Imunologia 283

Ana Lígia Bender ▪ Ana Paula Duarte de Souza ▪ Fernando Thomé Kreutz

CAPÍTULO 21 Imunidade Celular 285
Ana Lígia Bender ▪ Ana Paula Duarte de Souza ▪ Fernando Thomé Kreutz

CAPÍTULO 22 Imunidade Humoral 288
Ana Lígia Bender ▪ Ana Paula Duarte de Souza ▪ Fernando Thomé Kreutz

CAPÍTULO 23 Hipersensibilidade 289
Ana Lígia Bender ▪ Ana Paula Duarte de Souza ▪ Fernando Thomé Kreutz

CAPÍTULO 24 Reações Imunológicas 291
Ana Lígia Bender ▪ Ana Paula Duarte de Souza ▪ Fernando Thomé Kreutz

CAPÍTULO 25 Imunodeficiências 295
Ana Lígia Bender ▪ Ana Paula Duarte de Souza ▪ Fernando Thomé Kreutz

CAPÍTULO 26 Autoimunidade 299
Ana Lígia Bender ▪ Ana Paula Duarte de Souza ▪ Fernando Thomé Kreutz

CAPÍTULO 27 Marcadores Tumorais 305
Ana Lígia Bender ▪ Ana Paula Duarte de Souza ▪ Fernando Thomé Kreutz

CAPÍTULO 28 Doenças Infecciosas 309
Ana Lígia Bender ▪ Ana Paula Duarte de Souza ▪ Fernando Thomé Kreutz

Parte 7

Microbiologia 315

Pedro Alves d'Azevedo

CAPÍTULO 29 Montagem e Gerenciamento do Laboratório de Microbiologia 317
Lauro Santos Filho

CAPÍTULO 30 Gestão da Qualidade e Biossegurança em Laboratórios de Microbiologia Clínica 327
Cássia Maria Zoccoli ▪ Daniane Grando Remor Canali ▪ Nina Reiko Tobouti

CAPÍTULO 31 Coleta, Transporte e Processamento Inicial de Amostras Clínicas 345
Carmen Paz Oplustil

CAPÍTULO 32 Uroculturas 361
Alessandro Conrado de Oliveira Silveira ▪ Mara Cristina Scheffer

CAPÍTULO 33 Coprocultura 375
Vlademir V. Cantarelli

CAPÍTULO 34 Culturas de Amostras Genitais 385
Carlos Augusto Albini ▪ Helena Aguilar Peres de Mello de Souza

CAPÍTULO 35 Cultura de Secreções do Trato Respiratório 395
Juliana Caierão ▪ Alessandro Conrado de Oliveira Silveira

CAPÍTULO 36 Hemocultura e Cultura de Ponta de Cateter 405
Leandro Reus Rodrigues Perez ▪ Cícero Armídio Gomes Dias

CAPÍTULO 37 Líquor 409
Marcelo Pilonetto ▪ Pedro Alves d'Azevedo

CAPÍTULO 38 Culturas de Vigilância 415
Leandro Reus Rodrigues Perez ▪ Cícero Armídio Gomes Dias

CAPÍTULO 39 Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos 419
Jorge Sampaio ▪ Afonso Luís Barth

CAPÍTULO 40 Microbiologia Molecular 427
Gustavo Pelicioli Riboldi ▪ Vlademir V. Cantarelli

CAPÍTULO 41 Meios de Cultura 441
Pedro Alves d'Azevedo ▪ Juliana Caierão

CAPÍTULO 42 Microbiologia Automatizada 447
Marcelo Pilonetto ▪ Pedro Peloso

CAPÍTULO 43 Controle de Qualidade 461
Marinês Dalla Valle Martino ▪ Paula Koga ▪ Itacy Siqueira

Parte 8

Parasitologia 479
Lenilza Mattos Lima

CAPÍTULO 44 Protozoários 457

Complexo *Entamoeba Histolytica/Entamoeba Dispar* 481
José Mauro Peralta ▪ Regina Helena Saramago Peralta

Amebas Não Patogênicas do Intestino 485
Lenilza Mattos Lima

Giardia Lamblia 488
Karin Silva Caumo ▪ Lenilza Mattos Lima

Chilomastix Mesnili 490
Lenilza Mattos Lima

Cyclospora Cayetanensis 491
Alexandre Januário da Silva

Cryptosporidum spp. 494
Alexandre Januário da Silva

Cystoisospora Belli 497
Lenilza Mattos Lima

Blastocystis spp. 500
Lenilza Mattos Lima
Karin Silva Caumo

Amebas de Vida Livre 503
Marilise Brittes Rott
Karin Silva Caumo

Trichomonas Vaginalis 508
Tiana Tasca
Geraldo Attilio de Carli

Leishmania spp. 510
Marcos E. de Almeida
Catieli Gobetti Lindholz

Trypanosoma Cruzi 517
Silvia Maria Spalding

Plasmodium spp 521
Alexandre Januário da Sliva

Toxoplasma Gondii 531
Silvia Maria Spalding

CAPÍTULO 45 Helmintos 542
Alessandra Loureiro Morassutti ▪ Carolina De Marco Veríssimo

CAPÍTULO 46 Procedimentos Técnicos em Parasitologia 557
Alessandra Loureiro Morassutti ▪ Lenilza Mattos Lima ▪
Renata Russo Frasca Candido ▪ Tiana Tasca

CAPÍTULO 47 Diagnóstico Imunológico e Molecular 565
Alessandra Loureiro Morassutti ▪ Alexandre Januário da Silva

CAPÍTULO 48 Controle de Qualidade em Parasitologia 573
Vera Lucia Pagliusi Castilho ▪ Elenice Messias do Nascimento Gonçalves

Parte 9

Hematologia 583
Marcos Kneip Fleury

CAPÍTULO 49 Hematopoese 585
Marcos Kneip Fleury

CAPÍTULO 50 Anemias – Classificação e Diagnóstico Diferencial 600
Paulo Cesar Naoum

CAPÍTULO 51 Diagnóstico Laboratorial das Neoplasias Hematológicas 619
Flávio Naoum

CAPÍTULO 52 Infecções Bacterianas e Virais 639
Flávio Naoum

Parte 10

Hemostasia 645
Marcos Kneip Fleury

CAPÍTULO 53 Fisiologia da Hemostasia 647
Fernando Pretti

CAPÍTULO 54 Fatores da Coagulação 657
Fernando Pretti

CAPÍTULO 55 Abordagem do Paciente com Síndrome Hemorrágica 661
Fernando Pretti

CAPÍTULO 56 Púrpuras Vasculares 667
Fernando Pretti

CAPÍTULO 57 Trombocitopenias 671
Fernando Pretti

CAPÍTULO 58 Defeitos Funcionais das Plaquetas 675
Fernando Pretti

CAPÍTULO 59 Hemofilias 679
Fernando Pretti

CAPÍTULO 60 Doença de Von Willebrand 683
Fernando Pretti

CAPÍTULO 61 Coagulação Intravascular Disseminada 689
Fernando Pretti

CAPÍTULO 62 Trombofilia 693
Fernando Pretti

Parte 11

Micologia 703
Paulo Murillo Neufeld

CAPÍTULO 63 Diagnóstico Laboratorial das Infecções Fúngicas 705
Paulo Murillo Neufeld

ÍNDICE REMISSIVO 799

PARTE

1

Gestão Administrativa e Financeira

Humberto Façanha da Costa Filho

1

capítulo

Humberto Façanha da Costa Filho

Gestão Administrativa e Financeira

INTRODUÇÃO

O mercado é inexorável! Ainda que manipulado (subsídios, *dumping* etc.) continua impondo as suas regras. A falta de capacidade produtiva instalada para atender a determinada demanda, fatalmente irá provocar alta nos preços dos produtos, sejam eles bens, serviços ou informações. O inverso também é verdadeiro.

Atualmente, no mundo globalizado, a abertura do mercado internacional, a tecnologia que proporciona velocidade para a troca de informações (internet, web), a alta capacidade de transportar grandes volumes a grandes distâncias em curto espaço de tempo, e a imensa capacidade de armazenamento por tempo praticamente indeterminado são fatores que influenciam os preços de mercado e impactam diretamente na competitividade das empresas.

Hoje, um concorrente competente e agressivo pode estar na disputa por uma fatia dos clientes de determinada organização, que até ontem liderava o mercado local, ainda que distante de um grande centro. Em suma, isso mostra que ninguém está garantido, esteja onde estiver. Só há uma maneira de sobreviver: sendo competitivo em qualquer lugar do planeta! No caso específico dos laboratórios clínicos essa situação é cristalina.

Até o início dos anos de 1980, bastava o profissional da área estruturar um laboratório, na prática, sem se preocupar com a existência de mercado, calcular seus custos, adicionar a margem de lucro desejada, e impor aos clientes o "seu" preço. A concorrência era branda, havia mercado em expansão, a medicina não era socializada, os clientes pagavam à vista, a inadimplência inexistia. Era a época de "ouro" para o segmento das análises clínicas e seus correlatos. Quais as razões dessa situação maravilhosa? Reduzida capacidade produtiva, os exames eram feitos quase todos de forma manual, frente à demanda e mercado fechado para o mundo. Adicionalmente, não havia a cultura das ações judiciais e nem a consciência coletiva dos consumidores, proporcionada fundamentalmente pelo novo Código de Defesa do Consumidor (CDC) acrescido pelas exigências crescentes vinculadas à vigilância sanitária.

Hoje, os convênios são os principais compradores dos produtos (informações e serviços) dos laboratórios clínicos. São os atores intermediários entre os clientes e os laboratórios, frutos da socialização da medicina, que impõem os preços, pois a força do coletivo está com eles. O capital estrangeiro aportou nesse mercado alterando drasticamente o perfil da concorrência com fusões, aquisições e integrações entre fornecedores e prestadores de serviços! Foi o fim da era de "ouro" e o início da era do "euro/dólar". Atualmente, não basta simplesmente obter um diploma e abrir um novo laboratório. Não existe mais espaço para a aventura, para o amadorismo na gestão desses negócios. Há, sim, a imperiosa necessidade de gestões profissionais nos laboratórios. Se não formos competitivos, não sobreviveremos como empreendedores! É nesse contexto que se insere a proposta do Capítulo 1 do tratado.

REFERENCIAL TEÓRICO

A competitividade tão necessária para assegurar não só a sobrevivência digna, mas também as justas remunerações aos acionistas das organizações se originam, dentre outros requisitos, de uma gerência eficaz e eficiente na qual as decisões são tomadas com fundamento em dados e comparações competitivas. Mas o que significa isto? Ser competitivo é ter a maior produtividade entre os seus concorrentes e gerenciar uma organização significa controlar os seus processos. Os processos devem ser identificados, sendo rastreados para cada um, quais são os seus produtos, quem são os seus clientes e fornecedores, estabelecidos indicadores de desempenho (itens de controle e de verificação) nas dimensões pertinentes da qualidade (Qualidade intrínseca, Custo, Entrega, Moral e Segurança), metas e responsáveis. Ainda, o ciclo PDCA de gestão deve ser rodado de forma sistemática e permanente. Os processos devem ser padronizados e ter a documentação alterada em decorrência das inovações e de solução das não conformidades, caracterizando a melhoria contínua desses processos organizacionais, proporcionando uma situação de efetiva competitividade empresarial.

O estado da arte em gestão pode ser modelado pelos requisitos dos critérios que regulamentam os prêmios de qualidade ao redor do mundo. A variação das exigências não é significativa, existindo quase um "consenso" entre eles.

Vejamos o caso do Prêmio Nacional da Qualidade (PNQ), organizado pela Fundação Nacional da Qualidade (FNQ). Seus Critérios de Excelência "... constituem um modelo sistêmico de gestão adotado por inúmeras organizações de Classe Mundial. São construídos sobre uma base de conceitos fundamentais, essenciais à obtenção da excelência do desempenho. O Modelo de Excelência da Gestão® (MEG), em razão de sua flexibilidade e, principalmente, por não prescrever ferramentas e práticas de gestão específicas, pode ser útil para a avaliação, o diagnóstico e o desenvolvimento do sistema de gestão de qualquer tipo de organização".

O MEG está alicerçado sobre um conjunto de conceitos fundamentais da gestão. Esses conceitos originaram os Fundamentos da Excelência, os quais, por sua vez, são a base dos Critérios da FNQ. Esses Fundamentos são seguintes:

1. Pensamento sistêmico.
2. Aprendizado organizacional.
3. Cultura de inovação.
4. Liderança e constância de propósitos.
5. Orientação por processos e informações.
6. Visão de futuro.
7. Geração de valor.
8. Valorização das pessoas.
9. Conhecimento sobre o cliente e o mercado.
10. Desenvolvimento de parcerias.
11. Responsabilidade social.

Para os laboratórios é muito importante o fundamento de número 5 (Orientação por processos e informações), cujo conceito é: "Compreensão e segmentação do conjunto das atividades e dos processos da organização que agregam valor para as partes interessadas, sendo que a tomada de decisões e a execução de ações devem ter como base a medição e a análise do desempenho, levando-se em consideração as informações disponíveis, além de incluir-se os riscos identificados". O Modelo de Excelência da Gestão® (MEG) é baseado em 11 Fundamentos da Excelência e colocado em prática por meio de oito Critérios (ano de 2010):

1. Liderança.
2. Estratégias e planos.
3. Clientes.
4. Sociedade.
5. Informações e conhecimento.
6. Pessoas.
7. Processos.
8. Resultados.

O Modelo de Excelência da Gestão® (MEG) (Figura 1.1), representado pela figura mostrada a seguir, sugere uma visão sistêmica da gestão organizacional.

A Figura 1.1 representativa do MEG simboliza a organização, e é considerada um sistema orgânico e adaptável ao ambiente externo.

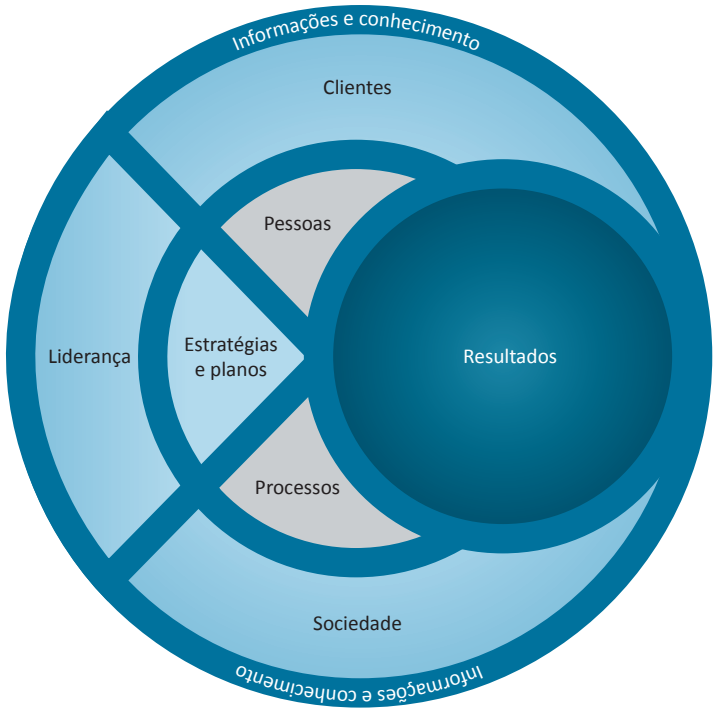


Figura 1.1 Modelo de excelência de gestão.
Fonte: Critérios de Excelência do PNQ, 2009.

O critério de número 5 (Informações e Conhecimento) é a envoltória dos demais, exatamente pela sua característica de fundamentar as decisões baseadas em dados e fatos que conduzem ao critério 8 (Resultados), onde todas as repercussões são quantificadas. As seguintes informações são requeridas para a sua construção (Critério 8 - Resultados):

1. Séries históricas de resultados relevantes que permitam analisar a sua tendência recente. Para tanto, é requerida a apresentação de resultados quantitativos decorrentes do sistema de gestão, observando-se pelo menos três períodos consecutivos, coerentes com ciclos de planejamento e de análise do desempenho na organização.
2. **Níveis de desempenho esperados:** associados aos principais requisitos de partes interessadas – para os resultados que os expressam, a fim de permitir avaliar se esses requisitos foram atendidos.
3. **Referenciais comparativos pertinentes:** para os resultados da organização que são comparáveis – no mercado ou no setor de atuação, na sua região de atuação ou mundialmente, a fim de permitir avaliar o nível de competitividade dos resultados alcançados pela organização.

Os indicadores de desempenho de um laboratório de análises clínicas, que mensuram os resultados alcançados, devem estar alinhados no *Balanced Scorecard* (BSC), no qual todas as partes interessadas dispõem de indicadores nas perspectivas pertinentes, viabilizando uma avaliação completa de todos os principais processos da organização.

SISTEMA INTEGRADO DE GESTÃO (SIG)

Na introdução ficou evidente a existência de um novo cenário para o universo dos laboratórios clínicos, uma nova realidade e novas necessidades: de profissionalismo na gestão administrativa, aumento da exigência por qualidade técnica certificada ou acreditada, e necessidade de tecnologia de ponta no cotidiano do laboratório. Todos esses requisitos serão tratados neste livro, sendo o enfoque do Capítulo 1 a Gestão Administrativa e Financeira. A necessidade dos laboratórios de competir, sobreviver, crescer ou manter uma fatia do mercado impõe a implantação de conceitos tais como: planejamento, finanças, custos, marketing, seis sigmas e outros, envolvendo uma profusão de novas teorias, técnicas e ferramentas, tornando imperiosa a implantação de uma gestão integrada com enfoque em custos. De forma sintética, um Sistema Integrado de Gestão (SIG) pode ser representado pelos conceitos mostrados na Figura 1.2.

Na Figura 1.2 fica evidente que o SIG é composto por três níveis de gestão, com exigências diferentes, mas que convergem para a chamada "Garantia da qualidade" definida pela competência do laboratório em produzir resultados tecnicamente válidos para a sociedade, sem, entretanto, deixar de assegurar a competitividade da organização. Esses níveis são: 1) A gestão estratégica de longo prazo, que se vincula à inovação e à eficácia, e envolve o laboratório com a aplicação dos critérios de excelência de prêmios nacionais, por exemplo, o PNQ; 2) O segundo nível contempla aquelas empresas que

Figura 1.2 Sistema Integrado de Gestão (SIG).
Fonte: Acervo do autor.

empregam o ciclo PDCA de forma habitual para promover a melhoria contínua do sistema de gestão, havendo registros dos resultados dos processos, ações preventivas, corretivas, planos de ação, análises críticas, auditorias e atualização sistemática da documentação decorrente do giro do PDCA. São as organizações com acreditação e/ou certificação da chamada terceira parte e, num plano estratégico, estariam operando no nível tático. E, finalmente, o terceiro nível de gestão: 3) vincula-se ao objetivo de a empresa dispor de processos produtivos, com capacitação adequada, sendo competente para fornecer resultados exatos e precisos, caracterizando a eficiência desses processos produtivos que, num plano estratégico, estariam operando no nível operacional. Laboratórios nessa condição são os acreditados pelas Sociedades Científicas, por exemplo, pelo Sistema Nacional de Acreditação (DICQ), patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC). Esse sistema, pelas suas exigências, também enquadra as empresas no nível tático, pois contempla os requisitos da melhoria contínua, dentre outros.

IMPLANTAÇÃO DO SISTEMA INTEGRADO DE GESTÃO (SIG)

Um método bastante efetivo, empregado pelas organizações na busca do SIG, é o chamado CA-PDCA demonstrado de forma sintética e autoexplicativa na Figura 1.3, em que todas as etapas estão evidenciadas.

O conteúdo da figura mostra, de forma resumida, que é feito um diagnóstico do laboratório segundo, por exemplo, os critérios de excelência do PNQ. Nesse diagnóstico são identificados pontos fortes e fracos da empresa, oportunidades de melhoria e a necessidade de ações imediatas, de curto prazo, para sanar problemas agudos encontrados nessa fase. A seguir, então, é elaborado um plano de implantação de longo prazo, em média com três a quatro anos de duração, em que basicamente se estabelecem as metas e o método para atingi-las. A próxima etapa é a de execução desse plano, onde previamente a força de trabalho é treinada e capacitada. Nessa fase é de suma importância que todos os dados resultantes dos processos sejam coletados de forma sistemática e padronizada. Na etapa seguinte é feita a verificação se o planejado foi alcançado em termos das metas estipuladas, bem como anualmente efetivadas avaliações conforme critérios de excelência do PNQ, no caso. Finalmente, em função dessa verificação, são propostas ações corretivas, mantidos os pontos fortes e atualizado o plano estratégico de longo prazo, reiniciando um novo ciclo do PDCA.

Detalhamento da implantação do SIG

O plano de implantação de longo prazo é realizado sobre três pilares: uma estrutura de recursos humanos – RH (*humanware*), um método (*software*) e uma estrutura física (*hardware*). A estrutura de RH deve ser fundamentada nos princípios da equidade, delegação e participação, materializados, por exemplo, na forma de comitês (Qualidade, integração, 5S's, participação nos resultados, grupos de solução de problemas etc.). O método deve contemplar uma organização definida e gerenciada por processos: cada processo (recepção, coleta) aten-

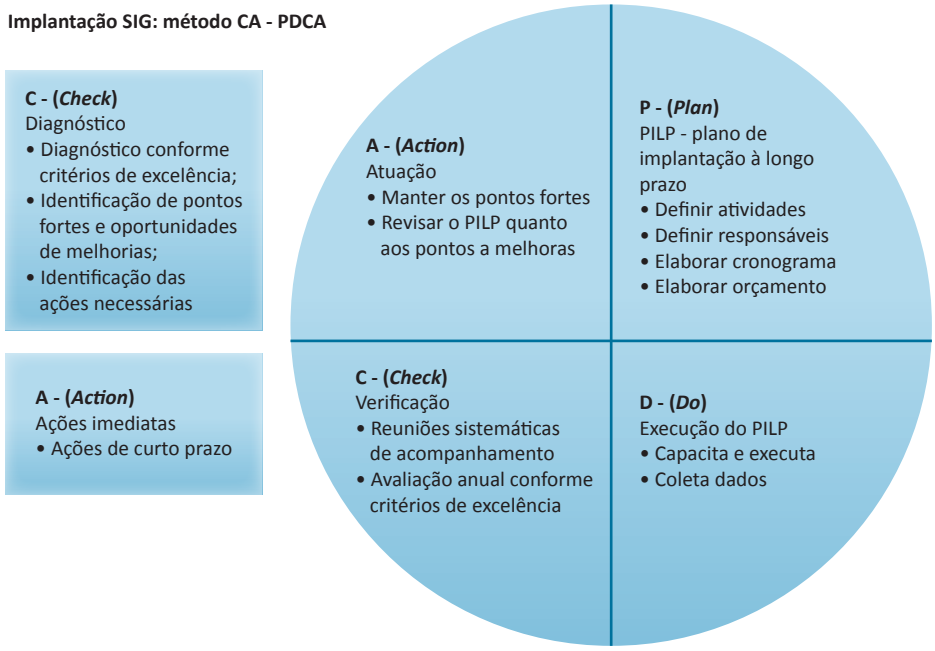


Figura 1.3 Método CA – PDCA.
Fonte: Acervo do autor.

de ao conjunto total de requisitos pertinentes; cada processo é integralmente identificado e parametrizado (clientes, fornecedores, indicadores de desempenho, metas); um único manual de gestão; uma única análise crítica, uma única auditoria; um único Sistema Integrado de Gestão (SIG) atendendo o ao rol dos critérios/requisitos: ISO 9001, SBAC-DICQ, RDC 302 Anvisa, ONA, e outros. Finalmente, a estrutura física deve ser composta por instalações adequadas às exigências legais e por equipamentos tecnologicamente capazes de atender aos requisitos de qualidade exigidos dos produtos (laudos).

Balanced scorecard

No item anterior, vimos que o SIG se fundamenta sobre três pilares: recursos humanos, método, e instalações/equipamentos. Considerando os propósitos do livro e capítulo, vamos nos deter ao pilar do método. Método significa caminho para a meta, ou seja, o meio para atingir um objetivo, que no caso é implantar o SIG. Esse sistema, em última análise, irá servir para aumentar a competitividade dos laboratórios, assegurando não só a sobrevivência, mas também a lucratividade esperada pelos empreendedores. Já vimos que para implantar o SIG devemos utilizar o método PDCA de gestão e que este contempla, na sua primeira etapa, a formulação do planejamento estratégico. Neste, é de suma importância o chamado *balanced scorecard*, que será objeto de detalhamento. A seguir, é mostrada de forma autoexplicativa, na Figura 1.4, a origem do *balanced scorecard*.

Objetivando consolidar o conceito dessa importante ferramenta de gestão, vamos detalhar um exemplo prático para laboratório, possibilitando ao leitor uma aplicação imediata dentro da realidade da sua empresa.

Balanced scorecard – exemplo prático

O planejamento estratégico contempla a definição do negócio da organização, a definição da visão, a formulação da política (missão) e dos princípios (valores) da qualidade.

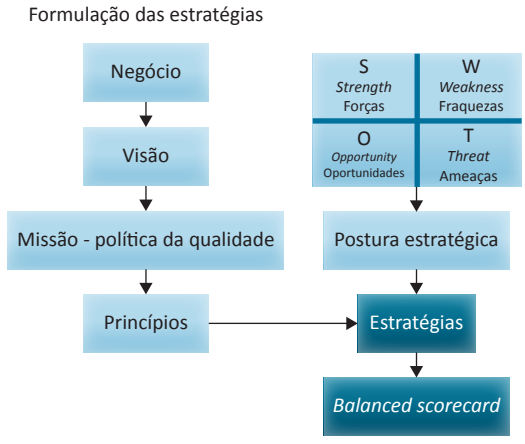


Figura 1.4 Origem do *balanced scorecard*.
Fonte: Acervo do autor.

A combinação desses itens com a matriz composta pela interação do ambiente externo (ameaças e oportunidades), no qual se insere o laboratório, com o ambiente interno (forças e fraquezas) da corporação, resulta na postura estratégica. Desta se originam as estratégias, insumo básico para a estruturação do *balanced scorecard,* conforme Tabela 1.1. A seguir será detalhado um exemplo prático aplicado a um laboratório de análises clínicas.

- **Visão:** Ser o laboratório de referência da região de atuação.
- **Missão:** Produzir exames com qualidade, atender às expectativas dos clientes e assegurar a melhoria contínua dos processos, garantindo o sucesso do negócio.

Princípios:

1. Manter constantemente a atenção no cliente, comprometendo-se com o bom atendimento e a qualidade dos exames.
2. Colocar-se sempre no lugar do cliente.
3. Proporcionar um ambiente de trabalho agradável e seguro.
4. Investir na educação e no treinamento dos colaboradores.
5. Promover o trabalho em equipe, com base em fatos e dados.
6. Manter o espírito empreendedor por meio de ações flexíveis e inovadoras.
7. Promover uma relação de parceria com os fornecedores.
8. Maximizar os resultados.

Postura Estratégica: Desenvolvimento.
Estratégias:

1. Aumentar o mercado.
2. Manter o foco no cliente.
3. Garantir a qualidade.
4. Controlar custos.

O conjunto de indicadores do *balanced scorecard* serve para controlar os processos do laboratório. No item Referencial teórico, vimos que qualquer organização é formada por um conjunto de processos, portanto, controlar uma organização é controlar os seus processos, decorrendo daí toda a importância dessa ferramenta. Adicionalmente, os indicadores de desempenho servem para medir se o laboratório está atingindo sua visão dentro do âmbito proposto no negócio. O pressuposto para chegar a esse objetivo é de que se aplicarmos os princípios (objetivos) da qualidade, isso nos levará à realização da missão (política da qualidade) da empresa e, por decorrência, da visão, garantindo o sucesso do negócio. Portanto, é de suma importância comprovar que os princípios e a política estão sendo gerenciados. Com essa finalidade, podemos utilizar o método a seguir descrito.

MÉTODO PARA CONTROLE DA POLÍTICA E DOS PRINCÍPIOS DA QUALIDADE

A política e os princípios da qualidade são asserções usadas pela empresa para anunciar os seus valores, os seus compro-

missos com e para a sociedade, bem como o caminho para implantá-los. Portanto, é fundamental que sejam controlados, gerenciados, pois só assim poderá se afirmar de fato que estão sendo seguidos. Criamos um método com esta finalidade. Como são asserções, basta decompor esses textos em suas frases que expressem em si, uma ideia, um pensamento, uma afirmação, em última análise, um processo. Uma vez obtidas essas sentenças isoladas, criar indicadores de desempenho para mensurar os resultados dos processos expressos pelas sentenças, estabelecer as metas para esses indicadores, e verificar de forma sistemática se foram atingidas. Dito de outro modo, girar o método PDCA de gestão para esse conjunto de indicadores de desempenho irá garantir de forma quantificada o controle da política e dos princípios da qualidade (Tabelas 1.2 e 1.3).

Tabela 1.1 Estrutura do *balanced scorecard*.

Perspectivas	Fatores críticos de sucesso	Indicadores críticos	Indicadores complementares
I – Financeira (Para sócios e acionistas)	1 – Equilíbrio financeiro 2 – Controle de riscos 3 – Custos dos investimentos	• Lucro • Geração de caixa • Margem de lucro • Retorno sobre os investimentos	• Razão operacional • Lucro por exame • Lucro por cliente • Ponto de equilíbrio • Margem de contribuição • Margem de segurança
II – Dos clientes (Para usuários finais)	1 – Adequação à expectativa 2 – Credibilidade 3 – Atendimento	• Satisfação dos clientes • Qualidade intrínseca • Exames entregues com atraso • Exames antecipados • Laudos incompletos • Tempo médio de atendimento	• Insatisfação dos clientes • Manutenção dos clientes • Exames realizados • Clientes atendidos
III – Interna (Para os funcionários)	1 – Motivação 2 – Confiabilidade	• Clima organizacional • Absenteísmo • Rotatividade • Taxa de acidentes • Frequência de acidentes	• Produtividade dos funcionários • Investimento com educação • Horas de treinamento por funcionário
IV – Interna (Para os processos internos)	1 – Registros 2 – Digitação	• Cadastros incompletos • Laudos não conformes	• Repetição de exames • Recoleta • Requisições com dados incompletos • Faturas erradas
V – Externa (Para logística/suprimentos e marketing)	1 – Volume 2 – Prazo 3 – Exatidão 4 – Divulgação	• Quantidades erradas • Entregas fora do prazo • Produtos errados • Convênios realizados	• Kits rejeitados
VI – Social (Para comunidade e meio ambiente)	1 – Cidadania 2 – Responsabilidade pública	• Impacto social • Impacto ambiental	• Exames para a assistência comunitária
VII – Inovação e aprendizagem (Para o crescimento sustentado do laboratório)	1 – Antecipação, visão de futuro	• Planejamento estratégico	• Novos serviços • Novas informações

Fonte: Acervo do autor.

Tabela 1.2 Indicadores para a política da qualidade – missão.

Política	Indicadores de desempenho	Interpretação
Produzir exames com qualidade...	IQI – Qualidade intrínseca ILI – Laudos incompletos IETA – Exames entregues com atraso	Laudos corretos e honrando o prazo prometido
... Atender às expectativas dos clientes...	ISC – Satisfação dos clientes ITMA – Tempo de atendimento IAREC – Atendimento na recepção IACOL – Atendimento na coleta IINC – Insatisfação dos clientes	Aprovação final do usuário
... Assegurar a melhoria contínua dos processos...	INC – Não conformidades abertas IEAC – Eficácia de ações corretivas IAP – Ações preventivas Auditorias e planejamento estratégico são ações complementares	Aprimoramento constante do desempenho
... Garantindo o sucesso do negócio	IGD – Indicador geral de desempenho Todos os demais indicadores da organização	Equilíbrio econômico e financeiro, crescimento sustentado da empresa

Fonte: Acervo do autor.

Tabela 1.3 Indicadores para os princípios (objetivos) da qualidade.

Princípios – objetivos	Indicadores de desempenho
1 – Manter constantemente a atenção no cliente, comprometendo-se com o bom atendimento e a qualidade dos exames	IQI – Qualidade intrínseca ISC – Satisfação dos clientes IINC – Insatisfação dos clientes ITMA – Tempo de atendimento IETA – Exames entregues com atraso ILI – Laudos incompletos
2 – Colocar-se sempre no lugar do cliente	IQI – Qualidade intrínseca ISC – Satisfação dos clientes IINC – Insatisfação dos clientes ITMA – Tempo de atendimento IETA – Exames entregues com atraso ILI – Laudos incompletos
3 – Proporcionar um ambiente de trabalho agradável e seguro	TF – Taxa de frequência
4 – Investir na educação e no treinamento dos colaboradores	IHT – Horas de treinamento por colaborador Provas de conhecimento
5 – Promover o trabalho em equipe, baseado em fatos e dados	Todos os indicadores de desempenho da organização

(*Continua*)

Tabela 1.3 Indicadores para os princípios (objetivos) da qualidade. (*Continuação*)

Princípios – objetivos	Indicadores de desempenho
6 – Manter o espírito empreendedor por meio de ações flexíveis e inovadoras	Todos os indicadores de desempenho da organização Planejamento estratégico
7 – Promover uma relação de parceria com os fornecedores	IPR – Produtos rejeitados IEF – Entregas fora dos prazos IPE – Produtos errados IQE – Quantidades erradas
8 – Maximizar os resultados	IPC – Produtividade dos colaboradores IQI – Qualidade intrínseca IREP – Repetição de exames IETA – Exames entregues com atraso ILI – Laudos incompletos TF – Taxa de frequência ISC – Satisfação dos clientes ICON – Convênios IGD – Geral de desempenho IF – Todos os indicadores financeiros

Fonte: Acervo do autor.

CONCLUSÃO

Vimos que as mudanças no ambiente externo aos laboratórios criaram novas exigências para o sucesso do negócio, necessidade de permanente atualização tecnológica, necessidade de certificações/acreditações, e uma necessidade premente de profissionalismo na gestão administrativa. Esse conjunto de requisitos, uma vez satisfeito, deve levar os laboratórios a se tornarem competitivos, assegurando sobrevivência e rentabilidade ao longo dos tempos. No quesito da gestão foi sugerido e detalhado um caminho seguro para solução: implantação de um Sistema Integrado de Gestão (SIG). Também foi mostrado um método para implantar o SIG, e um exemplo de aplicação eminentemente prático para a realidade de um laboratório, restando apenas, por não fazer parte do capítulo, o detalhamento do segmento dos recursos humanos e da infraestrutura das instalações físicas e dos equipamentos. Com isto, dentro do âmbito delimitado pelos objetivos do livro, encerramos o presente capítulo.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Bruni AL. Gestão de custos e formação de preços. São Paulo: Atlas, 2004.
2. Campos JA. Cenário Balanceado: Painel de indicadores para a gestão estratégica dos negócios. São Paulo: Aquariana, 1998.
3. Droms WG. Finanças para executivos não-financeiros. São Paulo: Bookman, 2002.
4. FAÇANHA
5. Façanha H, Prestes R. Cálculo dos custos e análise da rentabilidade em laboratórios clínicos. São Paulo: Eskalab, 2008.
6. Fundação Nacional da Qualidade. Critérios de Excelência 2010. São Paulo, 2009. [Internet] [Acesso em 30 mar 2017]. Disponível em: https://www.fnq.org.br/criterios_completo_isbn_pdf_-_FINAL.pdf
7. Gil AL. Qualidade Total nas Organizações. São Paulo: Atlas, 1992.
8. Oliveira ET. Planejamento financeiro para pequenas empresas. Porto Alegre: SEBRAE/FAURGS, 1997.
9. Porter M. Estratégia Competitiva – Técnicas para análise de indústrias e da concorrência. Rio de Janeiro: Campus, 1991.
10. Rosa NB. Ponto de equilíbrio: Análise gráfica para planejamento e monitoramento de pequenos negócios. Porto Alegre: SEBRAE, 2002.
11. Santos JJ. Fundamentos de custos para formação do preço e do lucro. São Paulo: Atlas, 2005.
12. Valadares MCB. Planejamento Estratégico Empresarial. Rio de Janeiro: Qualitymark, 2002.

PARTE

2

Gestão da Qualidade

Luiz Fernando Barcelos

2

capítulo

Luiz Fernando Barcelos ▪ José Abol Corrêa

Gestão da Qualidade

FONTE DE ERROS

Os erros, assim como em qualquer atividade, estão presentes também no laboratório, sendo suas fontes distribuídas nas três fases que envolvem a realização dos exames: fase pré-analítica, fase analítica e pós-analítica. O laboratório deve estar atento, incluindo no seu sistema da qualidade procedimentos que assegurem a prevenção e minimização dos erros. Esta é uma tarefa difícil e requer organização e persistência. A atenção e o conhecimento das causas dos erros são fundamentais para a implantação de ações preventivas com o objetivo de evitá-los, além de medidas para a detecção destes, quando ocorrerem. Também em cada ocorrência de erro devem ser realizadas ações corretivas para evitar a sua recorrência.

Na fase pré-analítica, a participação do médico na prevenção de erros é fundamental, porque a sua palavra é a mais ouvida e importante para o cliente, que muitas vezes não acredita que a influência de alguns fatores pré-analíticos pode resultar em alterações significativas nos resultados dos exames.

FREQUÊNCIA DOS ERROS

A frequência dos erros nos exames de laboratório foi avaliada por vários pesquisadores. O mais importante estudo foi realizado por Plebani num hospital universitário da Itália, com dez anos de duração (de 1996 a 2006), que encontrou uma frequência de 3.092 erros por milhão, correspondendo a 0,31% no ano de 2006, havendo significativa melhoria, pois em 1996, no início do estudo, a frequência era de 4.700 erros por milhão, correspondendo a 0,47%.

DISTRIBUIÇÃO DOS ERROS

A Tabela 2.1, a seguir, especifica o percentual de erros, nas três fases, encontrados em cinco trabalhos de pesquisa.

FASE PRÉ-ANALÍTICA

Inclui todas as etapas compreendidas entre o pedido médico e a fase instrumental da realização dos exames no laboratório. É uma fase decisiva, porque os fatores que incidem sobre ela podem afetar e até destruir os componentes e as propriedades que serão analisadas. Nenhum analista clínico, mesmo contando com a melhor tecnologia em equipamentos e reagentes, poderá realizar um bom exame a partir de uma amostra de má qualidade.

Considerações sobre o preparo e os hábitos dos pacientes

Existem muitos fatores que interferem nos resultados. Quando a interferência ocorre diretamente sobre o processo utilizado no laboratório, chama-se interação *in vitro*. Quando ocorre em função das modificações fisiológicas, ocasionadas pelo interferente no organismo, é denominada interação *in vivo* ou efeito colateral. Cabe ao médico e ao laboratório to-

Tabela 2.1 Distribuição dos erros nas três fases.

	Pré-analítica	Analítica	Pós-analítica
Plebani *et al*.	68%	13%	19%
Lapwort *et al*.	62%	32%	6%
Goldschimit *et al*.	53%	23%	24%
Nutting *et al*.	57%	13%	30%
Stahl *et al*.	75%	16%	9%

mar providências, no sentido de minimizar essas interferências e, na impossibilidade, é importante considerá-las na interpretação dos resultados. Quando existe um segundo exame do mesmo cliente, é importante verificar se as condições em que foram realizados os dois exames foram semelhantes.

Jejum e dieta

O jejum habitual e tradicional para exames de laboratório é de 8 horas, porém, na maioria dos casos, 4 horas são suficientes. Para alguns, o jejum não é necessário, enquanto, para outros, tais como Colesterol total, Colesterol-HDL, Colesterol-LDL, e Triglicerídios, o ideal é de 12 horas. Um jejum prolongado altera vários parâmetros: bilirrubina, aldosterona, glicerol, triglicerídios, ureia e ácido úrico.

O último Consenso que tratou do jejum para o perfil lipídico estabelece a possibilidade de flexibilizar o jejum. É recomendado ao laboratório, quando solicitado, realizar o exame sem jejum, sendo obrigatório no entanto que no laudo esteja explicitada esta condição e o tempo de decorreu após a última alimentação.

Além do jejum previsto, alguns exames tais como: Catecolaminas, Ácido Vanil Mandélico e Serotonina necessitam de uma dieta especial por três dias. A pesquisa de sangue oculto nas fezes, por método químico, também exige uma dieta especial, para evitar que a hemoglobina, alimentos e interferentes cromógenos provoquem resultados falso-positivos. Atualmente, a pesquisa da hemoglobina humana nas fezes pode ser realizada por teste imunológico, que dispensa essa dieta.

Hábitos alimentares

Os não vegetarianos tendem a ter aumento de ácido úrico, ureia e amônia comparados com os vegetarianos. Além disso, os vegetarianos exclusivos podem ter o LDL-Colesterol e o HDL-Colesterol mais baixos que os não vegetarianos. Já os lactovegetarianos têm o LDL-Colesterol e o HDL-Colesterol mais altos que os vegetarianos exclusivos.

Esgotamento (estresse)

Afeta as concentrações de muitos constituintes, tais como: Catecolaminas, Metabólitos, Glicose e alguns fatores de Coagulação.

Ritmo biológico (circadiano)

Em especial para exames hormonais, é interessante programar a data e/ou a hora para a coleta.

Para a dosagem de glicose, quando solicitada em jejum, o paciente deverá estar em jejum de 8 horas e a coleta deverá ser realizada até, no máximo, 10 horas. Após esse período, mesmo com o jejum de 8 horas, a coleta poderá ser feita, mas convém que se registre no laudo o horário da coleta.

Ferro Sérico, ACTH e Creatinina estão 30% a 50% mais elevados pela manhã. O ideal é que sejam coletados antes das 10 horas.

O Cortisol apresenta valores mais altos pela manhã (6 horas) do que à tarde. Tradicionalmente é coletado pela manhã (entre 7 e 9 horas) ou à tarde (entre 16 e 17 horas) ou nos dois horários.

Os Triglicerídios, a Ureia, o Fósforo e o Urobilinogênio urinário estão mais altos à tarde.

O Hormônio do crescimento, a Aldosterona e a Fosfatase ácida, encontram-se mais elevadas às 6 horas do que às 15 horas.

Idade

Os valores de alguns parâmetros bioquímicos são dependentes da idade e de outros fatores, como maturidade funcional dos órgãos e sistemas, conteúdo hídrico e massa corporal. Esses fatores influenciam notadamente nas fases neonatal e de crescimento quando, inclusive, é necessário adotar intervalos de referência diferenciados para esses períodos.

Os mesmos fatores afetam os resultados dos indivíduos idosos, porém com menor intensidade. Nos idosos ocorre diminuição da capacidade de hematopoiese, determinando menor produção de eritrócitos por unidade de tempo, provocando maior facilidade de desenvolvimento de anemias. O LDL-Colesterol aumenta progressivamente a partir dos 20 a 30 anos de idade.

Na parte hormonal ocorrem as maiores mudanças nos idosos:

Aumentos	
Masculino	Estrona livre, estradiol livre, FSH e LH. Se houver hiperplasia prostática, aumenta também a di-hidrotestosterona.
Feminino	Testosterona ovariana, FSH e LH.
Ambos os sexos	Norepinefrina, vasopressina e insulina.
Diminuições	
Masculino	Testosterona, testosterona livre, Androsterona, androstenediona, de-hidroepiandrosterona e sulfato de de-hidroepiandrosterona
Feminino	Estrona, estradiol, progesterona, androsterona, de-hidroepiandrosterona, sulfato de de-hidroepiandrosterona.
Ambos os sexos	Tri-iodotironina (T3), ACTH e Somatomedina.

Gênero

Além das diferenças hormonais específicas e características de cada sexo, outros parâmetros, em decorrência de

diferenças metabólicas, massa muscular e de outros fatores apresentam diferenças como a Fosfatase alcalina, Ácido úrico, CK, AST, ALT e Ureia que são mais altas nos homens.

Exercício

Os exercícios físicos modificam a concentração de vários constituintes do sangue em especial CK. Vejamos alguns estudos realizados (Figura 2.1).

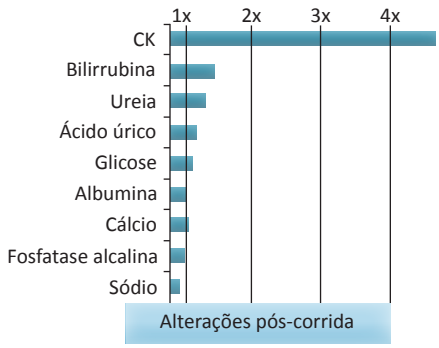


Figura 2.1 Alterações pós-corrida.

Também o Potássio, a Prolactina e a Aldosterona aumentam após trabalho muscular vigoroso, e até em exercícios mais suaves, ocorrendo de modo especial aumento significativo do Lactato em até dez vezes, e na Renina em quatro vezes.

Pessoas em treinamento físico de longo prazo têm aumento de Androsterona, Androstenediona, Cortisol, hGH, Colesterol HDL, LH, Prolactina, Proteína total, Testosterona, T3 livre, T4 livre e Ureia, Ácido úrico e Creatinina.

Hematúria e Proteinúria podem aparecer como consequência de exercício, sendo diretamente proporcionais à intensidade e duração.

Tabagismo

Os tabagistas têm níveis sanguíneos mais altos de Carboxi-hemoglobina, Epinefrina, 11 hidroxicorticoides (até 75%), Cortisol (até 40%), Aldosterona, Hemoglobina, Eritrócitos, VCM, Leucócitos (até 30%), Triglicerídios, Glicose, CEA e Amilase.

Pode ocorrer, também, redução dos níveis de Colesterol HDL e da enzima conversora da Angiotensina.

Consumo de álcool

Uma dose moderada e isolada de álcool tem pouco efeito nos testes de laboratório. Dose maior isolada pode aumentar o Ácido úrico, o Lactato e os Triglicerídios. A ingestão contínua de Etanol pode aumentar os níveis de Ácido úrico, ALT, AST, Gastrina, GLDH, GGT, Colesterol HDL, Cortisol, Magnésio, Triglicerídios, e reduzir os valores da Glicemia.

A ingestão recente de álcool (2 a 6 horas antes da coleta) pode provocar diminuição de Glicose, Bicarbonato, Osteocalcina, Prolactina, Cortisol, e aumento de Triglicerídios, Ácido úrico, Ácido lático e Aldosterona.

Medicamentos

As interferências causadas por drogas podem se dar por meio de dois mecanismos:

1. Mecanismo fisiológico da droga e seus metabólitos.
2. Mecanismo analítico da droga *in vitro*, resultante de alguma propriedade física ou química, que interfere no ensaio laboratorial. É especialmente importante a interferência das drogas nas provas hepáticas, aumentando os níveis da Fosfatase alcalina, Bilirrubinas, ALT, AST e Gama GT devido à indução das enzimas microssomais, lesão ou colestase intra-hepática. Os contraceptivos orais aumentam a concentração no sangue de Ceruloplasmina, Tireoglobulina, α-1-tripsina, Transferrina, Ferro, Triglicerídios, ALT e Gama GT, e diminuem as concentrações de Albumina, Mucoproteínas e Zinco.

O uso de antibióticos interfere nos resultados das Culturas e do Antibiograma.

Medicamentos locais

Nas coletas de secreções (uretral, vaginal, ferida, pústula, lesões etc), o uso de medicamentos locais deverá ser suspenso quatro dias antes da coleta.

Drogas de abuso

Podem interferir nos resultados dos exames.

A maconha aumenta a Insulina, o Sódio, o Potássio e a Ureia e diminui a Creatinina, o Ácido úrico e a Glicose.

A heroína aumenta o Colesterol, o Potássio e T4, diminuindo a Albumina e o pO_2.

A morfina provoca aumento na AST, ALT, Amilase, Lípase, Bilirrubinas, Fosfatase alcalina, Gastrina e TSH, causando diminuição na Norepinefrina e Insulina.

Postura

A permanência no leito determina uma retenção de líquidos no compartimento intravascular, e devido a essa diluição ocorre diminuição da concentração no sangue das substâncias não filtráveis. Na posição ereta existe um outro equilíbrio, com a passagem desses líquidos do compartimento intravascular para o intersticial, determinando uma hemoconcentração e, com isso, Proteínas totais, Albumina, Tiroxina, Renina, Catecolaminas, Cálcio, Bilirrubinas, Colesterol, Triglicerídios, várias Enzimas, Hemoglobina, e Drogas aumentam no sangue. Esse efeito é muito importante na comparação de resultados de pacientes internados (pacientes internos) e pacientes ambulatoriais (pacientes externos). Statland mediu os mesmos analitos nas seguintes condições:

1. Indivíduos na posição ereta ou sentada.
2. Os mesmos indivíduos na posição deitada por 30 minutos.

Ciclo menstrual

Na ovulação há redução dos níveis de Colesterol em relação às demais fases do ciclo. Durante o período menstrual as

plaquetas diminuem em até 10%. Os hormônios relacionados ao ciclo menstrual variam significativamente nas diversas fases do período.

Gravidez

Na gravidez ocorre aumento do volume plasmático, causando hemodiluição e também aumenta o índice de filtração glomerular: a depuração da Creatinina pode aumentar em 50%. No 2º e 3º trimestres de gestação ocorre aumento do metabolismo lipídico, com consequente elevação dos níveis séricos de Apolipoproteínas, Triglicerídios, e principalmente do LDL-Colesterol. Retornam ao normal geralmente após dez semanas.

Também se elevam os resultados de α-1-antitripsina, Amilase, Fosfatase alcalina e cortisol.

Ocorre a diminuição de Albumina sérica, Cálcio, Folatos, Vitamina C, Imunoglobulinas, Hemoglobina, Eritrócitos, Ureia e Ácido úrico.

Peso corporal

Algumas avaliações hormonais e depurações necessitam da informação do peso corporal para seu cálculo.

O Ácido úrico, o Colesterol e a Glicose estão geralmente mais elevados no grupo de alto peso.

Hemólise

A hemólise devido à punção venosa ou decorrente da anemia hemolítica eleva as Bilirrubinas, Transaminases, LDH, Magnésio e Potássio, e de forma mais discreta a Fosfatase alcalina, o Ferro, o Fósforo e as Proteínas totais.

Também pode prejudicar os resultados dos testes de coagulação.

Sazonalidade

Alguns parâmetros têm concentrações diferentes de acordo com as estações do ano.

A Vitamina C tem seus níveis mais altos no verão devido à maior exposição ao sol, e o T4 é mais baixo no verão do que no inverno.

Altitude

Os níveis do Hematócrito e da Hemoglobina podem se elevar em 8% em pessoas que vivem em altitudes de 1.400 metros.

A Proteína C-reativa pode elevar-se em 65% a 3.600 metros de altitude.

Renina plasmática, Transferrina, Creatinina urinária e Estriol decrescem com a altitude.

Manobras médicas

A massagem e a palpação da próstata alteraram os níveis do PSA.

CUIDADOS NA COLETA DOS MATERIAIS BIOLÓGICOS

Instruções para pacientes

Os pacientes devem receber instruções escritas, em linguagem clara, objetiva e de fácil entendimento. Também é conveniente que as instruções escritas sejam transmitidas oralmente, confirmando o entendimento pelo paciente.

Identificação

A identificação dos tubos e recipientes deve ser feita perante o cliente, e caso a caso. É um dos erros mais graves do laboratório, pois a troca de materiais implica em vários erros.

Local da punção

O local da punção é importante, principalmente em pacientes internados que estão recebendo solução parenteral. O acesso deve ser feito em outro braço e deve ser informada ao laboratório a administração via parenteral. Também é importante citar que os valores de alguns parâmetros são diferentes no sangue venoso, arterial e capilar.

Garroteamento

O garroteamento utilizado para localizar a veia, quando prolongado, produz aumento das Proteínas, Enzimas e substâncias ligadas a proteínas tais como: Colesterol, Cálcio, Ferro e Triglicerídios devido ao seu aumento no espaço intravascular em função da saída dos fluidos com baixo peso molecular para o espaço intersticial. O ideal é um garroteamento leve e por um período inferior a 1 minuto.

Dificuldade na punção

A dificuldade para puncionar uma veia difícil pode determinar a entrada de líquidos tissulares em excesso, que podem alterar as provas de coagulação.

Contaminação

Coletas de urina para culturas e coletas para hemocultura podem ter contaminação bacteriana.

CRITÉRIOS DE REJEIÇÃO DE AMOSTRAS

O laboratório clínico deve ter um procedimento que especifique os critérios de aceitação e rejeição das amostras para os exames. O procedimento de rejeição das amostras pode ocorrer tanto na fase pré-analítica quanto na fase analítica.

As amostras de sangue podem ser rejeitadas por:

- Falta de identificação no tubo da amostra.
- Coleta realizada em frasco inadequado para o exame requisitado.
- Apresentar volume insuficiente para o exame solicitado.
- Armazenagem da amostra de forma inadequada ao estabelecido para o exame.

- Preparo inadequado do paciente.
- Falta de confiança na qualidade da amostra.
- Coleta da amostra fora do horário especificado.
- Amostra hemolisada.

NOTA 1

A hemólise é a causa mais frequente de rejeição de amostras de sangue. Ela pode aparecer na obtenção da amostra por:

- Punções repetidas.
- Uso prolongado de torniquete.
- Veias finas ou frágeis.
- Inadequado processamento de separação e estocagem da amostra.
- Cateter parcialmente obstruído.
- Diâmetro da agulha inadequado.
- Contaminação de álcool da pele para amostra.
- Exposição da amostra a temperaturas extremas.
- Centrifugação a alta velocidade.
- Transporte inadequado.

NOTA 2

A hemólise determina alterações nas dosagens de K, LDH, CK, CK-MB etc.

NOTA 3

Para a obtenção da amostra de sangue com anticoagulante é imprescindível respeitar a proporção de sangue para o anticoagulante especificado.

Exemplo 1:

Excesso de sangue coletado com Citrato de sódio determina o encurtamento dos testes de coagulação, e a insuficiência, o alongamento.

Exemplo 2:

O sangue coletado para hematologia, quando a sua quantidade é insuficiente, vai diminuir o valor do hematócrito, provocando alterações na coloração da lâmina e mudanças morfológicas nas hemácias.

Exemplo 3:

Sangue em excesso coletado com Fluoreto de sódio provoca hemólise.

As amostras de urina podem ser rejeitadas por:

- Falta de identificação no recipiente da amostra.
- Coleta que não obedeceu às especificações.
- Apresentar volume insuficiente para o exame solicitado.
- Apresentar contaminação fecal ou vaginal.
- Tempo de armazenagem superior ao especificado.
- Conservação inadequada após a coleta.
- Coleta em frasco inadequado.
- Urinas coletadas com mais de 1 a 2 horas para a pesquisa de *Trichomonas.*

As amostras de fezes podem ser rejeitadas por:

- Falta de identificação no recipiente da amostra.
- Coleta em frasco inadequado.
- Armazenagem superior à permitida para análise.
- Preparo inadequado do paciente.
- Contaminação com urina ou com outros materiais.
- Fezes em estado sólido, quando solicitadas para cultura.

As amostras de secreções, exsudatos, transudatos e líquidos biológicos podem ser rejeitadas por:

- Falta de identificação no recipiente da amostra.
- Não ter obedecido à especificação de coleta.
- Apresentar volume insuficiente para o exame solicitado.
- Apresentar contaminação com outro tipo de material.
- Armazenagem da amostra por tempo superior ao especificado.

FASE ANALÍTICA

Compreende a fase instrumental, incluindo reagentes, calibração e controle. Nessa fase os erros podem ser de dois tipos:

Erros sistemáticos ou viés

São os erros que têm sempre a mesma direção e são previsíveis. Suas fontes podem ser o instrumento, a calibração ou o operador. É possível reduzi-los, sendo sua eliminação completa muito difícil. São caracterizados pelo afastamento que ocorre entre o valor verdadeiro e o valor médio obtido, e podem ser quantificados. São responsáveis pela inexatidão, ou seja, a diferença entre o valor obtido e o valor real. São avaliados pelo Bias.

Erros aleatórios, assistemáticos ou ao acaso

Podem ser negativos ou positivos com direção e magnitudes imprevisíveis. Ocorrem sempre, mas não é possível determinar o seu valor. Não são eliminâveis, mas podem ser minimizados. São decorrentes da variabilidade analítica e responsáveis pela imprecisão dos resultados.

Erro total

É a soma dos efeitos do erro aleatório e do erro sistemático (Bias) e aleatório.

CONTROLE INTERNO DA QUALIDADE

É o controle intralaboratorial. Consiste na análise diária de amostras-controle, com valores conhecidos, dosadas simultaneamente com as amostras dos pacientes, com o objetivo de monitorar a precisão dos resultados.

Implantação

A implantação do controle interno da qualidade em um laboratório clínico é de exclusiva responsabilidade do responsável técnico ou de profissional por ele designado, e deve ser realizado cumprindo as seguintes etapas:

a) Escolher a amostra-controle a ser utilizada.
b) Estabelecer a média, desvio-padrão e coeficiente de variação da amostra-controle aplicando os cálculos estatísticos.
c) Elaborar o gráfico de Levey-Jennings referente a cada analito determinado no laboratório clínico.
d) Implantar uma rotina de determinações da amostra-controle de valor e variabilidade conhecidas, assim como treinar e conscientizar o pessoal técnico responsável pela utilização do sistema analítico.

Materiais de controle

Os materiais de controle e suas amostras são ferramentas fundamentais no controle da qualidade analítica, razão pela qual devem ter uma matriz, a mais próxima possível, semelhante às amostras dos pacientes, possibilitando deste modo maior credibilidade das determinações realizadas nestas.

Tipos de materiais de controle

Existem diversos tipos de materiais de controle para as áreas do laboratório clínico. Eles podem ser diferenciados pela composição de sua matriz. O ideal é que sejam os mais similares possíveis com as amostras dos pacientes. Entretanto, em algumas situações podem ser utilizados com vantagens os materiais baseados em matriz animal.

Escolha da amostra-controle

1. Para implantação do controle interno da qualidade em Bioquímica podem ser utilizadas as amostras-controle:
   - Comerciais, liofilizadas ou líquidas, provenientes de soro humano ou animal.
   - Provenientes de um "*pool*" de soro humano preparado.
   - Provenientes de um "*pool*" de soro animal.
   - Soluções sintéticas às quais foram acrescentadas as substâncias representativas dos analitos a serem avaliados, com concentrações especificadas.

NOTA 4

Para evitar o efeito matriz, sempre que possível, deve ser dada preferência ao material de origem humana.

2. Para determinações imunológicas (imunologia de doenças infecciosas, hormônios, marcadores tumorais, drogas terapêuticas etc.) podem ser usadas como controle interno as seguintes amostras-controle:
   - Comerciais, liofilizadas ou líquidas, provenientes de soro humano.
   - Provenientes de um "*pool*" de plasma humano, obtidos em Bancos de Sangue ou de amostras de soro do próprio laboratório.
   - Provenientes de soro animal, submetidos à inoculação de antígenos humanos resultantes de patologias a serem examinadas.
   - Amostras divididas.
3. Para determinações hematológicas podem ser utilizadas como controle interno as seguintes amostras-controle:
   - Comerciais, oriundas de empresas fabricantes de equipamentos, de reagentes ou de fornecedores de amostras-controle.
   - Provenientes de provedores de ensaios de proficiência.
   - Amostras de pacientes do dia anterior.
   - Regra do três: Multiplicar o valor dos dois primeiros dígitos das hemácias por 3 = Hemoglobina; multiplicar a Hemoglobina por 3 = Hematócrito. Esta é uma fórmula de controle, que não deve ser usada para as determinações desses analitos, pois não representam a realidade quando há microcitose ou macrocitose.
   - Algoritmo de Bull: VCM, CHCM e HCM.
   - Amostra dividida.
4. Para determinações de componentes químicos em urinálise podem ser utilizadas como controle interno as amostras-controle:
   - Comerciais, líquidas, provenientes de fabricantes tradicionais de amostras-controle.
   - Provenientes de provedores de ensaios de proficiência.
   - Preparação artificial do próprio laboratório ou "pool" de urina.
   - Amostra dividida.
5. Para determinações da avaliação dos elementos anormais em urinálise utilizando as tiras reagentes (*screening*) podem ser usadas como controle interno as amostras-controle:
   - Comerciais, líquidas ou liofilizadas provenientes de fabricantes internacionais de amostras-controle.
   - Provenientes de provedores de ensaios de proficiência.
   - Preparação artificial do próprio laboratório ou "*pool*" de urina.
   - Amostra dividida.
6. Para determinações microbiológicas podem ser usadas como controle interno as amostras-controle:
   - Bactérias validadas provenientes de organismos de validação de bactérias, como a ATCC, IPT, Adolfo Lutz, Manguinhos.
   - Provenientes de provedores de ensaios de proficiência, com sua identificação validada pelos mesmos.
   - Fase pré-analítica: meios de cultura, corantes e processos.
7. Para controle interno em Parasitologia, Citologia clínica, Bacterioscopia e determinação específica do Hemograma sugerimos que o laboratório clínico estabeleça uma rotina de garantia da qualidade, com verificação por outro profissional de 10% das amostras positivas de pacientes, para alguma patologia, e as negativas, para confirmação dos laudos.

NOTA 5

Essa verificação dever ser registrada para comprovar a execução deste processo de validação e de precisão.

8. Para líquidos biológicos temos de levar em consideração que:
   a) Geralmente é um material escasso.
   b) Raramente é solicitado ao laboratório.
   c) Não existem amostras-controle disponíveis.
   d) Testes pluralizados: proteínas, celularidade, bacterioscopia, cultura, bioquímicos etc.

NOTA 6

Sugestão de controle interno: amostra dividida ou teste supervisionado.

9. Para outras especialidades ou analitos, para os quais não existem amostras-controle disponíveis, o laboratório clínico deve aplicar um método alternativo para esse controle e que estão estabelecidos na norma CLSI GP29-A.

   Os procedimentos alternativos de avaliação interna da qualidade são:

   - Amostra dividida, em que o laboratório clínico envia para outro laboratório ou outro profissional uma alíquota de sua amostra para confirmação de resultado. Esse outro laboratório pode ser o seu laboratório de apoio.
   - Utilização de amostras de pacientes em que os resultados foram confirmados por correlação clínica.
   - Repetição das dosagens sob a supervisão de outro profissional.
   - Utilização de calibradores de fabricantes dos reagentes.
   - Utilização das amostras-controle dos provedores de ensaios de proficiência.
   - Utilização das médias obtidas em amostras de pacientes.
   - Utilização das faixas de valores de referência.
   - Revisão de lâminas por outro profissional ou supervisor em análises morfológicas.

   Quando é utilizado um método alternativo, o próprio laboratório deve definir o seu limite de aceitação, assim como a frequência com que ele deve ser realizado, registrando os resultados obtidos.

Preparação de soro-controle a partir de uma mistura (*pool*) de soros

É um processo econômico de utilizar um soro-controle para o controle interno em laboratório clínico.

- Coletar diariamente, em frasco plástico, as sobras de soros do dia, do próprio laboratório.
- Descartar os soros que sejam reagentes para doenças infecciosas, os lipêmicos, os ictéricos e os hemolisados.
- Estocar o frasco no congelador.
- Quando obtiver um volume suficiente de soro, retirar o frasco do congelador para descongelar, que pode ser feita em banho-maria a 37 °C ou em temperatura ambiente.
- Após o descongelamento completo, homogeneizar por agitação por cerca de uma hora.
- Filtrar a mistura através de capa grossa de gaze ou centrifugar em alta rotação para eliminar o máximo de turvação.
- Dosar os analitos e avaliar a necessidade de acrescentar os que estão com baixa concentração, de acordo com suas necessidades.
- Agitar bem após o acréscimo para dissolver a substância acrescentada.
- Filtrar ou centrifugar de novo, se necessário, para diminuir a turvação.
- Aliquotar em tubos, em quantidade suficiente para a utilização diária, tampar, rotular e congelar a menos 20 °C.
- Para a utilização diária, retirar um tubo do congelador e deixar descongelar normalmente à temperatura ambiente antes do uso.

NOTAS 7 E 8

1 O manuseio deve ser realizado o mais asséptico possível, com o intuito de não haver contaminação excessiva do soro-controle. Pode ser avaliada a possibilidade de acrescentar Azida sódica para evitar a contaminação, desde que não haja interferência da mesma nas metodologias das dosagens.

2 O volume do material deve ser o suficiente para a utilização pelo prazo de um ano.

Determinação da média, desvio-padrão e coeficiente de variação

A determinação da média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação da amostra-controle utilizados no controle interno da qualidade é de exclusiva responsabilidade do laboratório clínico. No caso de utilização de soros-controle comerciais, com valores conhecidos, validados, as suas médias e a sua variabilidade informada devem ser confirmadas pelo usuário, utilizando os processos estatísticos, do seguinte modo:

- Dosar diariamente cada parâmetro vinte vezes, no mínimo, em dias diferentes.
- A amostra-controle deve ser analisada de modo idêntico às amostras dos pacientes.
- Determinar, com esses vinte valores, a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação.
- Elaborar o gráfico de Levey-Jennings e avaliar os resultados, seguindo as regras estabelecidas por Westgard.

Elaboração dos gráficos de controle

Após o cálculo da média e do desvio-padrão, o laboratório clínico deve elaborar o gráfico de Levey-Jennings em papel quadriculado para cada analito examinado. Esse gráfico, que é utilizado somente para valores numéricos, deve ser in-

terpretado pelo pessoal designado antes de liberar os resultados diários de cada rodada de exames.

O gráfico de Levey-Jennings pode ser construído manualmente, do seguinte modo:

a) Selecionar uma folha de papel quadriculado e registrar a rotulagem do gráfico com o nome do teste ou analito, nome e número de lote do material de controle, unidades de medida, a média e o desvio-padrão obtido, e a identificação do instrumento.
b) *Preparar a escala do eixo x*: o eixo horizontal ou eixo x representa o tempo. Criar uma escala dividida igualmente para acomodar trinta dias ou trinta corridas analíticas. Colocar o título do eixo x, que pode ser: Dias ou Corridas analíticas.
c) *Preparar a escala do eixo y:* o eixo vertical ou eixo y representa os valores observados dos controles, sendo necessário ajustar a escala para acomodar o menor e o maior valor esperado. Para criar uma escala adequada deve-se acomodar valores que vão da média -4 desvios-padrão a valores da média +4 desvios-padrão. A criação de uma escala para acomodar as concentrações esperadas para valores da Tabela 2.1, escalar valores de média (90) menos 4 desvios-padrão (4 × 2) e média (90), mais 4 desvios-padrão (4 × 2). Assim, os valores estão distribuídos entre 82 e 98. Marcar as concentrações apropriadas no eixo y e colocar o título, que pode ser: Concentrações ou Valores dos controles.
d) *Marcar as linhas da média e dos limites de controle*: localizar no eixo y o valor correspondente à média e traçar uma linha horizontal. Localizar os valores correspondentes a -1s, -2s, e -3s, e +1s, +2s, e +3s, e traçar linhas horizontais. Um exemplo do mapa de Levey-Jennings é mostrado na Figura 2.2.

Com a utilização de métodos de boa precisão e exatidão, os valores encontrados de cada analito na amostra-controle devem apresentar seus pontos plotados no gráfico de Levey-Jennings entre os limites de ± 2 desvios-padrão, ficando os mesmos distribuídos, aproximadamente, a metade de cada lado, e a reta que liga os mesmos deve cruzar a linha da média. É comum um resultado em cada 20 ficar fora dos limites de ± 2 desvios-padrão, pois o limite de confidência é de 95% (Figura 2.2).

Observações

1. Uma das vantagens da aplicação dos gráficos de Levey-Jennings ou de Shewart é a possibilidade de, visualmente, após a inserção de cada ponto, avaliar o desempenho da determinação da amostra-controle.
2. Existem programas de computadores que auxiliam o laboratório na elaboração do gráfico e na aplicação das regras de Westgard, possibilitando uma decisão logo após a inserção do resultado diário do soro-controle.
3. Os participantes do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) podem acessar a ferramenta PROIN em tempo real, no site do programa, para a avaliação dos resultados desse controle.

CONTROLE EXTERNO

É o controle interlaboratorial em que os resultados de cada teste são comparados com a média de consenso dos dados agrupados por metodologias. Os laboratórios participantes analisam amostras-controle de concentrações desconhecidas. É uma ferramenta que visa a avaliar a exatidão dos métodos empregados. Os laboratórios recebem periodicamente amostras de valor desconhecido, realizam as determinações, e os resultados encontrados são enviados ao provedor até uma data-limite. Após o tratamento estatístico dos dados a avaliação é encaminhada ao laboratório sob a forma de relatório para permitir uma análise detalhada e providências quanto às correções necessárias.

É fundamental que a análise dos relatórios feita pelo laboratório seja com ênfase especial para os resultados com desvio da média de consenso acima da permitida, mas também é importante a análise de todos os demais resultados na busca de tendências que podem estar ocorrendo. Na maioria das vezes, um mau resultado pode estar precedido de resultados tendenciosos em avaliações anteriores, e acabam levando a um desvio indesejado da média.

TRANSPORTE DO MATERIAL BIOLÓGICO

Tempo

O tempo entre a coleta do material e a realização dos exames deve ser o mínimo possível. Quando as coletas são

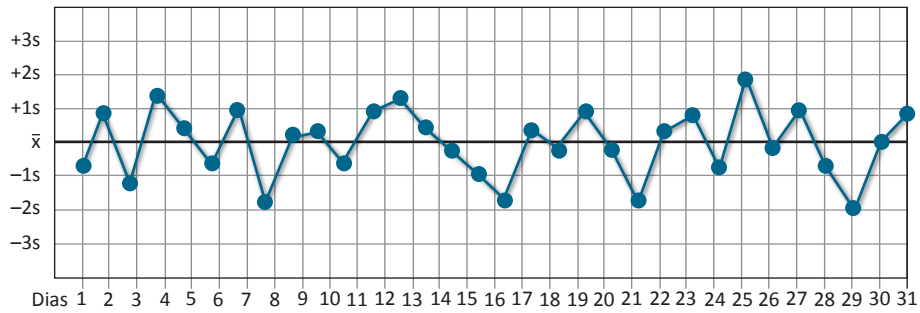


Figura 2.2 Gráfico de Levey-Jennings.

realizadas em postos de coleta ou em unidades hospitalares é importante que exista um sistema contínuo de transporte.

Temperatura

O material, quando é transportado, deve ser acondicionado em recipientes térmicos para garantir a sua integridade, e embalado de acordo com a legislação vigente.

FASE PÓS-ANALÍTICA

Etapas realizadas após a fase analítica, necessárias para que os resultados obtidos cheguem ao destino (médicos e clientes).

Transcrição dos resultados

Transcrição errada, números ou letras mal-escritas induzindo a erro.

Laudo

Informações de difícil interpretação, mal-expressas ou incompletas podem gerar confusão na interpretação dos exames.

Avaliação médica do resultado

A interpretação dos resultados é talvez a mais importante desta fase. Resultados mal-interpretados podem causar grande dano ao cliente e, muitas vezes, repercutir no laboratório e ocasionar descrédito.

GARANTIA DA QUALIDADE

A Garantia da Qualidade é o conjunto de atividades planejadas e sistemáticas do Laboratório Clínico com o objetivo de garantir que o seu serviço atende aos requisitos da qualidade. A Garantia da Qualidade engloba as atividades relacionadas aos processos pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos. Portanto, o seu objetivo é assegurar que o produto final de suas atividades seja adequado às necessidades e satisfação do cliente. Para garantir a qualidade de seus serviços, o laboratório deve implantar um Sistema de Gestão da Qualidade, que possa dar sustentação a todas as suas atividades. É importante que os laboratórios ofereçam serviços que superem as expectativas de seus clientes, não atendendo apenas às suas necessidades, mas indo além delas.

VARIABILIDADE BIOLÓGICA (VB)

É a variação resultante de fatores próprios, particulares e característicos de cada indivíduo, sendo independente das variáveis pré-analíticas. Reflete, ao acaso, as flutuações dos níveis dos constituintes em torno de pontos homeostáticos. A variabilidade biológica não é dependente do sistema diagnóstico empregado, nem dos operadores do laboratório, sendo uma característica com grandeza individual.

A existência da variabilidade biológica é um conhecimento antigo, mas somente a partir de 1999 Carmen Ricos e colaboradores elaboraram uma base de dados que é atualizada periodicamente. Todos os pesquisadores sobre esse assunto estão convidados a informar seus dados para cricos@hg.vhebron.es para permitir uma atualização constante da tabela.

ESPECIFICAÇÕES DA QUALIDADE ANALÍTICA

É o nível de desempenho do laboratório clínico para dar suporte às decisões médicas.

Em abril de 1999, na cidade de Estocolmo, na Suécia, foi realizada a conferência denominada "*Strategies to set Global Quality Specifications in Laboratory Medicine*" com o objetivo de obter consenso e estabelecer especificações globais da qualidade laboratorial.

As estratégias foram hierarquizadas com respeito ao grau com que atendem às necessidades médicas:

1. Avaliação do efeito do desempenho analítico em decisões clínicas específicas.
2. Avaliação do efeito do desempenho analítico em decisões clínicas gerais:
   a) especificações gerais da qualidade baseadas na Variação Biológica (VB);
   b) especificações gerais da qualidade baseadas em opiniões médicas.
3. Recomendações profissionais publicadas:
   a) recomendações de grupos de especialistas nacionais e internacionais;
   b) recomendações de especialistas ou de grupos institucionais.
4. Metas de desempenho analítico baseadas em comparações interlaboratoriais:
   a) especificações da qualidade definidas por regulamento (Ensaios de Proficiência - EP);
   b) especificações da qualidade definidas por provedores de programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ).
5. Dados publicados com base no estado da arte:
   a) dados do estado da arte extraídos de programas EP e AEQ;
   b) metodologias individuais publicadas.

O modelo de *Avaliação do efeito do desempenho analítico em decisões clínicas específicas,* que é considerado o melhor modelo, tem aplicação difícil, limitada, e ainda não é bem compreendido pelos profissionais da saúde. Sendo assim, o modelo que utiliza os componentes da Variação Biológica (VB) e que ocupa a segunda posição na tabela hierarquizada de modelos passa a ser o modelo de escolha pelas seguintes características:

- Imprecisão e bias definidos.
- Baseado nas necessidades médicas.
- Aplicáveis a todos os laboratórios, independentemente do porte, do tipo ou da localização.
- Construídos a partir de modelos simples, facilmente compreensíveis e coerentes.

Sendo assim, podem ser estabelecidas as especificações da qualidade analítica ou metas de desempenho do laboratório clínico baseadas na variabilidade biológica. Esse modelo tem sido recomendado por especialistas dedicados ao estudo da qualidade laboratorial.

Níveis da especificação da qualidade para o erro aleatório (imprecisão)

Ótimo	CVa igual ou menor que 0,25 CVi
Desejável	CVa igual ou menor que 0,50 CVi
Mínimo	CVa igual ou menor que 0,75 CVi

CVa = Coeficiente de variação analítica
CVi = Coeficiente de variabilidade intraindividual

Níveis de especificação da qualidade para o erro sistemático (Bias)

Ótimo	$ES = 0{,}125 \times (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$
Desejável	$ES = 0{,}25 \times (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$
Mínimo	$ES = 0{,}375 \times (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$

ES = Erro sistemático ou Bias
CVi = Coeficiente da variabilidade intraindividual
CVg = Coeficiente de variabilidade interindividual

Níveis da especificação da qualidade para o erro total

Ótimo	$ET = ES\ ótimo + 1{,}65 \times CVa\ ótimo$
Desejável	$ET = ES\ desejável + 1{,}65 \times CVa\ desejável$
Mínimo	$ET = ES\ mínimo + 1{,}65 \times CVa\ mínimo$

ET = Erro total
ES = Erro sistemático
CVa = Coeficiente de variação analítica
1,65 = Escore Z da distribuição gaussiana

OBSERVAÇÃO

Os níveis desejáveis são os mais utilizados e aplicáveis para a maioria dos analitos. Ocorre que, para alguns, principalmente aqueles homeostaticamente bem regulados, o nível desejável é tão baixo que não é possível obtê-lo mesmo utilizando sistemas reagentes e equipamentos avançados. Por esta razão, recomenda-se que sejam utilizadas as especificações ótimas para os analitos com maior variabilidade biológica, e as mínimas para aqueles com menor variabilidade biológica.

SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E ACURÁCIA

Sensibilidade diagnóstica

É a probabilidade de um teste dar resultado "POSITIVO", quando o paciente analisado tem a doença ou o marcador da doença estudada, isto é, avalia a capacidade do teste em detectar a doença quando ela está presente.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

VP = Verdadeiro positivo
FN = Falso-negativo

Portanto, um teste com 99% de sensibilidade indica que, em 100 indivíduos doentes ou com o marcador da doença, o resultado será positivo em 99 casos e haverá 1 resultado falso-negativo.

Quanto maior a sensibilidade, menor será o número de resultados falso-negativos.

NOTA 9

O nível mais baixo que um método é capaz de detectar com boa precisão é chamado de "sensibilidade analítica ou limiar de detecção" e não deve ser confundido com a sensibilidade diagnóstica. Utiliza-se muito o limiar de detecção nas pesquisas qualitativas.

ESPECIFICIDADE DIAGNÓSTICA

É a probabilidade de um teste dar resultado "NEGATIVO", quando o paciente analisado não tem a doença ou o marcador da doença, isto é, avalia a capacidade do teste em afastar a doença quando ela está ausente.

$$\text{Especificidade} = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

VN = Verdadeiro negativo
FP = Falso-positivo

Portanto, um teste com 99% de especificidade indica que, em 100 indivíduos não doentes ou sem o marcador da doença, o resultado será negativo em 99 casos e haverá 1 resultado falso-positivo.

Quanto maior a especificidade de um teste, menor será o número de resultados falso-positivos.

NOTA 10

A quantidade máxima de substâncias potencialmente interferentes, que podem estar presentes sem causar problemas no desempenho de um método, estabelece a especificidade analítica desse método e não deve ser confundida com a especificidade diagnóstica.

Não existem testes diagnósticos perfeitos, capazes de acertar todos os diagnósticos, pois simultaneamente deveriam apresentar 100% de sensibilidade diagnóstica e 100% de especificidade diagnóstica. Portanto, acurácia de 100%.

O estudo das curvas de distribuição de frequência demonstra que quando se quer ganhar na sensibilidade, necessariamente haverá perda na especificidade, assim como o

inverso é verdadeiro e, portanto, sempre existirá a possibilidade de resultados falso-positivos, falso-negativos ou ambos.

ACURÁCIA DO TESTE

É a proporção de testes verdadeiramente positivos e verdadeiramente negativos em relação à totalidade dos resultados.

$$\text{Acurácia} = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN}$$

VP = Verdadeiro positivo
VN = Verdadeiro negativo
FP = Falso-positivo
FN = Falso-negativo

Nos testes imunológicos, a maior frequência de resultados falso-positivos e falso-negativos ocorre na região próxima ao limiar de reatividade (*cut-off*) e vai diminuindo na medida em que se afastam desta zona.

As limitações e as diferenças de desempenho (sensibilidade diagnóstica e especificidade diagnóstica) entre os testes decorrem de questões tecnológicas que cada fabricante procura resolver na busca de maior eficiência. É possível que existam resultados diferentes quando os testes são realizados com reagentes diferentes.

VALOR PREDITIVO DOS RESULTADOS

As decisões clínicas são baseadas em informações sobre o paciente, obtidas mediante procedimentos diagnósticos. Todo o meio utilizado para obter informações científicas de um paciente pode ser considerado um procedimento diagnóstico: história clínica, exame físico, exames de laboratório, exames por imagem, exames por traçados gráficos, e outros.

A prevalência de uma doença é representada pelo número de indivíduos doentes dentro de uma população considerada. O exame físico e a história clínica do paciente são as maiores e melhores ferramentas para aumentar a prevalência da doença num indivíduo, à medida que possibilitam melhor seleção e classificação dos pacientes, para os quais serão solicitados os exames.

Um teste ideal de laboratório deveria ser capaz que separar corretamente os indivíduos doentes dos indivíduos não doentes, e então não haveria resultado falso-positivo ou falso-negativo. Infelizmente, não existe teste que preencha esse requisito. Portanto, é necessário conviver com a existência de testes falso-positivos e falso-negativos e administrá-los.

Valor Preditivo Positivo (VPP ou VP+)

É a probabilidade de doença ou presença do marcador da doença num paciente com o resultado positivo de um teste. É influenciado pela prevalência da doença. O valor preditivo positivo somente pode ser de 100% se a especificidade do teste utilizado for de 100%. Testes com alta especificidade têm valor preditivo positivo também alto, e devem ser utilizados principalmente nas situações em que é importante que os pacientes com resultados positivos sejam corretamente identificados (testes confirmatórios).

$$\text{Valor preditivo positivo} = \frac{VP}{VP + FP} \times 100$$

VP = Verdadeiro positivo
FP = Falso-positivo

Valor Preditivo Negativo (VPN ou VP-)

É a probabilidade de não ter a doença ou do marcador da doença num paciente com o resultado negativo de um teste. É pouco influenciado pela prevalência. O valor preditivo negativo somente pode ser de 100% se a sensibilidade do teste utilizado for de 100%. Testes com alta sensibilidade têm valor preditivo negativo também alto e devem ser utilizados principalmente nas situações em que é importante que os pacientes com resultados negativos sejam corretamente identificados (testes de triagem).

$$\text{Valor preditivo negativo} = \frac{VN}{VN + FN} \times 100$$

VN = Verdadeiro negativo
FN = Falso-negativo

Prevalência da doença

A prevalência de uma doença é a proporção de indivíduos de um grupo ou de uma população que apresentam esta doença. Não pode ser confundida com incidência, que é uma medida de casos novos de uma doença num período de tempo determinado. A prevalência se reflete a todos os indivíduos afetados, independentemente da data em que contraíram a doença.

A prevalência de uma doença, provavelmente, é o fator mais importante, mas também o menos compreendido. Afeta significativamente a utilidade do resultado de um teste, porque tem forte influência sobre o valor preditivo do teste. Quanto maior a prevalência da doença, maior o valor preditivo positivo de um teste positivo; quanto menor a prevalência, maior o valor preditivo negativo de um teste negativo. Um bom exame físico e uma história clínica corretamente interpretada são essenciais para uma boa prática médica, assim como são fundamentais para o uso eficaz dos testes de laboratório, porque selecionam pacientes com maior prevalência da doença e, com isso, aumentam o valor preditivo positivo dos resultados. No diagnóstico da hepatite, por exemplo, a história de uma transfusão de sangue separa a população em dois grupos: aqueles que receberam transfusão, e por isso têm maior risco e maior prevalência de hepatite do tipo B do que aqueles que não receberam transfusão. O mesmo ocorre quando o paciente tem sua atividade profissional na área da saúde, pois pertence a um grupo de risco de maior prevalência para hepatite B do

que os profissionais de outras atividades. Da mesma forma, a prevalência para Anti-HIV reagente é muito maior numa população prisional do que na população em geral, porque pertencem a grupos de risco diferentes, e por isso o valor preditivo de um resultado positivo desse exame, quando realizado na população prisional, também é maior do que quando realizado na população em geral.

$$\text{Prevalência} = \frac{VP + FN}{VP + FP + FN + VN} \times 100$$

VP = Verdadeiro positivo
FN = Falso-negativo
FP = Falso-positivo
VN = Verdadeiro negativo

Valor preditivo positivo do resultado de um exame, isto é, a capacidade desse exame em identificar corretamente os indivíduos doentes ou com presença do marcador depende da especificidade do sistema diagnóstico utilizado no laboratório (componente de responsabilidade técnico-laboratorial), pois quanto mais específico o sistema diagnóstico, menos falso-positivos serão encontrados, aumentando o valor preditivo positivo desse resultado.

O valor preditivo negativo de um resultado, isto é. a capacidade desse exame em identificar corretamente os indivíduos não doentes depende da sensibilidade do sistema diagnóstico utilizado no laboratório, sendo menos influenciado pela prevalência da doença. Portanto, o valor preditivo negativo do exame depende de sua sensibilidade e diminui com o aumento da prevalência da doença.

Deve-se ter muito cuidado na interpretação de exames realizados, tais como: *check-up*, pré-natal, pré-operatório, admissional, demissional ou ao acaso, porque esses pacientes, provavelmente, têm a prevalência para a doença semelhante à da população em geral, isto é, baixa prevalência. Portanto, os resultados desses exames têm valor preditivo positivo também baixo devido à maior influência de resultados falso-positivos. Porém, os resultados negativos desses exames são muito relevantes, devido ao alto valor preditivo negativo, devido à menor influência de resultados falso-negativos nesses casos. Também estão incluídos nesse contexto os exames solicitados com a finalidade de excluir doenças e, ainda, aqueles solicitados em caráter defensivo para evitar problemas que possam ser levantados em relação à má prática e dano moral.

Na população com baixa prevalência para a doença os resultados positivos podem ser pouco conclusivos, mas os resultados negativos são bons excludentes de doença.

VALORES CRÍTICOS

São os resultados cujos valores representam risco grave ao paciente, e que os laboratórios devem, após confirmados, comunicar imediatamente ao médico assistente. Na impossibilidade de contato direto com o médico, a comunicação deve ser feita com a enfermagem ou familiar.

Quantitativos	
Adultos	
Ácido úrico	**> 13,0 mg/dL**
	Risco de nefropatia aguda por ácido úrico, com bloqueio tubular à insuficiência renal. Em tal circunstância, o quociente ácido úrico/creatinina na urina (de uma micção) é > 1,0 mg/mg.
Antitrombina	**< 50%**
	Indicativo de deficiência considerável de inibidor, o qual, em presença de uma atividade aumentada de pró-fatores da coagulação constitui alto risco de complicações tromboembolíticas.
Amilase	**> 200 UI/L**
	Possibilidade de aneurisma aórtico abdominal, pancreatite crônica, obstrução do ducto biliar, obstrução intestinal, infecção supurativa, abscesso hepático, câncer hepático.
Aminotransferases	**> 1.000 UI/L**
	Dependendo da população atendida no consultório ou clínica correspondente.
Amônea	**> 100 mg/dL (59 mmol/L)**
	Risco de encefalopatia hepática. Os estados comatosos iniciam habitualmente a partir de > 300 mg/dL (176 mmol/L).
Bilirrubina total	**> 15,0 mg/dL (257 mmol/L)**
	Enfermidade hepatobiliar produzida predominantemente por viroses hepatotrópicas com risco de contágio.

Quantitativos	
Adultos	
Cálcio total	**< 6,6 mg/dL (1,65 mmol/L)**
Cálcio iônico	**< 3,1 mg/dL (0,38 mmol/L)**
	Risco de tetania hipocalcêmica.
Cálcio total	**> 14,0 mg/dL (3,50 mmol/L)**
Cálcio iônico	**> 6,3 mg/dL (1,60 mmol/L)**
	Risco de crise hipercalcêmica associada a sintomas, tais como: déficit de volume, encefalopatia metabólica e sintomas gastro-intestinais.
Cloretos	**< 75 mmol/L**
	Indicativo de alcalose metabólica considerável.
	> 125 mmol/L
	Indicativo de acidose metabólica primária maciça ou pseudo-hipercloremia, em caso de intoxicação por brometos.
Creatinina	**> 7,40 mg/dL (654 mmol/L)**
	Insuficiência renal aguda, por exemplo devido a uma insuficiência multiórgãos ou de uma sépsis.
CK total	**> 1.000 UI/L**
	Dependendo da população atendida no consultório ou clinica correspondente.
Dímeros D	**Positivo ou dosagem aumentada**
	Em presença de uma CIVD, a detecção ou o valor aumentado de D dímeros indica a presença de fase II - ativação descompensada do sistema hemostático ou de fase III - quadro clínico completo de CID.
Digoxina	**> 2,0 mg/dL (2,56 nmol/L)**
	Possibilidade de arritmia sinusal, bradicardia e sintomas extracardíacos, tais como: cansaço, debilidade muscular, náuseas, vômitos, letargia, cefaleia. Distintos graus de bloqueio auriculoventricular.
Digitoxina	**> 40 mg/dL (52 nmol/L)**
	Os mesmos da digoxina.
Etanol	**> 3,5 g/L (76 mmol/L)**
	Concentração sanguínea de 3 a 4 g/L pode ser fatal quando em uso simultâneo com medicamentos.
Fibrinogênio	**< 0,8 g/dL**
	Risco de hemorragia.
Fósforo inorgânico	**< 1,0 mg/dL**
	Possibilidade de dores musculares, sintomas do sistema central tais como: desorientação, confusão, convulsão, coma, insuficiência respiratória com acidose metabólica**.**
	> 9,0 mg/dL
	Esses valores aparecem na síndrome de lise tumoral aguda e na insuficiência renal terminal.

Quantitativos	
Adultos	
Glicose	**< 45 mg/dL**
	Risco de sintomas neurológicos de hipoglicemia, que podem estender-se desde uma diminuição da função cognitiva até a inconsciência.
	> 450 mg/dL
	Risco de coma diabético devido à falta de insulina. Desenvolvimento de uma diurese osmótica com desidratação grave e cetoacidose diabética.
Hematócrito	**< 18%**
	Corresponde a uma concentração de hemoglobina < a 6,0 g/dL. O miocárdio recebe uma quantidade insuficiente de oxigênio.
	> 61%
	Significa uma intensa hiperviscosidade do sangue. A resistência ao fluxo circulatório está elevada; situação de ameaça de insuficiência cardiocirculatória.
Hemoglobina	**< 6,6 g/dL**
	Os mesmos do hematócrito.
	> 19,9 g/dL
	Os mesmos do hematócrito.
Lactato	> 45 mg/dL
	Indicativo de uma hiperlactacidemia do tipo A, que causa uma diminuição no recebimento de O_2 nos tecidos. O metabolismo do ácido pirúvico deixa de ser oxidativo para ser predominantemente redutor.
LDH	**> 1.000 UI/L**
	Dependendo da população atendida no consultório ou clinica correspondente.
Leucócitos	**< 2.000/μL**
	Perigo elevado de infecção, quando a contagem dos granulócitos for inferior a 500/mL.
	> 50.000/μL
	Indicativo de uma reação leucemoide. Por exemplo, sépsis ou leucemia.
Lipase	**> 700 UI/L** (Método turbidimétrico)
	> 225 U/L (Método colorimétrico)
	Indicativo de pancreatite aguda.
Magnésio	**< 1,0 mg/dL**
	Risco de sintomas, tais como: parestesia, cãibras musculares, irritabilidade, tetania. As arritmias cardíacas aparecem, em geral, quando existe ao mesmo tempo hipopotassemia, e são intensificadas pelos digitálicos.
	> 4,9 mg/dL
	Diminuição da transmissão neuromuscular, resultando em sedação, hipoventilação com acidose respiratória, debilidade muscular, diminuição dos reflexos tendinosos.
Mioglobina	**> 110 μg/L**
	Suspeita de infarto do miocárdio em pacientes com *angina pectoris.*

Quantitativos	
Adultos	
Sódio	**< 120 mmol/L**
	Intenso transtorno da tonicidade (distribuição de água entre o espaço intracelular e extracelular) devido a um distúrbio do hormônio antidiurético, da ingestão de água ou da capacidade de concentração e diluição renais. Os sintomas clínicos de uma hiponatremia intensa são resultantes do déficit de volume.
	> 160 mmol/L
	As principais manifestações de uma hipernatremia severa são os distúrbios do sistema nervoso central, tais como: desorientação e aumento da excitabilidade neuromuscular com tremores e ataques convulsivos.
Osmolaridade	**< 240 mOsm/kg**
	Edema celular com aumento do volume celular e aparecimento de sintomas neurológicos e psiquiátricos.
	> 330 mOsm/kg
	Intensa hiperviscosidade do sangue. A resistência ao fluxo circulatório está elevada, situação discreta de insuficiência cardiocirculatória.
PCO_2	**< 19 mmHg**
	Hiperventilação.
	> 67 mmHg
	Hipoventilação.
pH	**< 7,20**
	Acidose gravemente descompensada representando perigo de morte.
	> 7,60
	Alcalose gravemente descompensada representando perigo de morte.
PO_2	**< 43 mmHg**
	Esses valores correspondem a uma saturação de oxigênio da hemoglobina inferior a 80% e, portanto, pode-se considerar risco de vida.
Protrombina	**Tempo > 27 s ou Atividade < 50%**
	Diminuição dos fatores da coagulação dependentes da vitamina K (fatores II, VII e X) ou do fator V. Como todos esses fatores são produzidos pelo fígado, uma redução do tempo de protrombina, a esses níveis, traduz um transtorno considerável da capacidade de síntese. Em uso de terapia cumarínica existe o risco de sangramento se a atividade da protrombina for inferior a 15%, equivalente a um RNI de aproximadamente > 4.
Plaquetas	**< 20.000/uL**
	Risco de sangramento. Descartar uma trombocitopenia induzida por EDTA.
	> 1.000.00/uL
	Risco de trombose.
Troponina	**> 1,0 mg/L (1,0 μg/mL)**
	Indicativo de infarto do miocárdio ou *angina pectoris* instável.

Quantitativos	
Adultos	
T3	**> 30 mg/L e**
T4 livre	**> 35 ng /L (3,5 ng/dL)**
	Indicativos de tireotoxicose, condição detetável clínica e laboratorialmente, em que os tecidos são submetidos a uma hiperconcentração de hormônios tireoideos e, então, reagem frente a isso. As causas podem ser: enfermidade de Basedow, tumores trofoblásticos, adenoma hiperfuncionante da glândula tireoide, bócio nodular tireotóxico e, raras vezes, uma hiperprodução de hormônio tireoestimulante (TSH).
Tromboplastina	**Tempo > 75 s**
(ATTP)	Deficiência ou inativação dos fatores VII, VIII, IX, XI ou XII, com perigo de sangramento. Em tratamento com heparina há perigo de sangramento se a ATTP está aumentada em mais de 2,5 vezes o limite superior de referência.
Ureia	**> 214 mg/dL (35,6 mmol/L)**
	Indicativo de insuficiência renal aguda, com aumento proporcional entre a ureia e a creatinina. Nas alterações pré-renal e pós renal, os aumentos da ureia e da creatinina não são proporcionais.
Recém-nascidos	
Bilirrubinas	**> 14 mg/dL (239 mmol/L)**
	No primeiro dia de vida, indicativo de doença hemolítica do recém-nascido, com risco de encefalopatia por bilirrubina.
Glicose	**< 30 mg/dL (1,7 mmol/L)**
	Hipoglicemia devido a transtorno congênito, ou hiperinsulinismo devido a *diabetes mellitus* da mãe. A concentração de glicose < 25 mg/dL (1,3 mmol/L) deve ser tratada mediante administração parenteral de glicose.
Glicose	**> 325 mg/dL (18,0 mmol/L)**
	Deve ser investigada a causa com urgência.
Hematócrito	**< 33%**
	Indicativo de anemia severa, com suprimento inadequado de oxigênio nos tecidos.
	> 71%
	Hiperviscosidade do sangue, com aumento da resistência circulatória.
Hemoglobina	**< 8,5 g/dL**
	Risco de falência múltipla de órgãos, especialmente em pacientes com combinação de isquemia e hipóxia.
	> 23%
	Hiperviscosidade do sangue, com aumento da resistência circulatória e sobrecarga do coração.
IgM	**> 20 mg/dL**
	Uma concentração de IgM acima do limite pode estar correlacionada a uma infecção intrauterina.
Leucócitos	**< 5.000/μL**
	Pode indicar sépsis neonatal.
	> 25.000/μL
	Pode indicar sépsis neonatal.
Potássio	**< 2,6 mmol/L**
	Ocorrência de sintomas neuromusculares, com hiporreflexia e paralisia dos músculos respiratórios.
	> 7,7 mmol/L
	As consequências clínicas são: distúrbio do ritmo cardíaco, debilidade da musculatura esquelética e paralisia respiratória.

Quantitativos

Recém-nascidos

PO_2	**< 37 mmHg**
	Queda da saturação de oxigênio da hemoglobina, levando a valores abaixo de 85%.
Plaquetas	**< 100.000/μL**
	Em recém-nascidos de peso normal esse resultado deve ser investigado. Em recém-nascidos com peso inferior a 2.500 g, o valor limite é de 50.000/μL.
Proteína C-reativa	**> 5,0 mg/L**
	Indicativo de sépsis neonatal.

Qualitativos

Líquido cefalorraquidiano

Aumento da contagem de células.

- Leucocitose, presença de células tumorais.
- Glicose mais baixa que 2/3 da do soro.
- Lactato > 20 mg/dL (2,2 mmol/L).
- Detecção de microrganismos no Gram ou provas de aglutinação.

Urina

- Reação fortemente positiva para glicose e acetona nas tiras reagentes.
- Presença de cilindros eritrocitários.
- Mais de 50% dos eritrócitos deformados.
- Hemoglobinúria nas tiras reagentes, sem presença de eritrócitos no exame do sedimento ao microscópio.
- Pesquisa positiva para drogas.

Leucograma

- Reação leucemoide.
- Suspeita de leucemia.
- Suspeita de aplasia.
- Presença de células falciformes.
- Presença de agentes da malária.

Microbiologia

- Pesquisa direta ou cultural de microrganismos em exsudatos e transudatos, procedentes de cavidades.
- Pesquisa positiva para agentes infecciosos, tais como: Estreptococos do Grupo B, Legionelas, *Pneumocistis carinii*, *Cryptococcus* etc.
- Pesquisa positiva para BAAR.
- Coprocultura positiva para *Salmonella, Shigella, Campilobacter, Vibrio* e *Yersinea*.
- Pesquisa positiva para *C. dificile*, *C. perfingens*, *N. gonorrhoeae*, *B. pertussis*, *M. meningitidis*, *C. diphteriae* e fungos, como *Aspergilus, Blastomyces, Coccidioides*, Histoplasma.
- Hemocultura positiva.

Imunologia/Imuno-hematologia

- Teste de Coombs direto ou indireto em espécimes de rotina.
- Teste de Coombs positivo em cordão umbilical.
- Teste positivo confirmado para hepatite, sífilis e HIV.
- Aumento dos níveis de anticorpos para agentes infecciosos.

INDICADORES DA QUALIDADE

O conceito de indicador está associado a um modelo e a uma variável aleatória em função do tempo. A utilização de indicadores no laboratório clínico permitirá ao administrador conhecer o seu desempenho e tomar as medidas preventivas ou de melhoria antes de serem transformadas em não conformidades. A importância dos indicadores pode ser definida em três parágrafos:

a) Se os indicadores não podem ser definidos e calculados não podem ser medidos.
b) Se não podem ser medidos, os processos não podem ser controlados.
c) Se os processos não podem ser controlados, não podem ser introduzidas as melhorias.

Portanto, os indicadores quanto às suas características devem ser:

a) **Simples**: indicador de fácil obtenção dos dados, de elaboração, de calcular e de ser compreendido.
b) **Pertinente e específico**: é a capacidade de medir quantitativamente e mostrar claramente só a evidência que se quer controlar.
c) **Reproduzível**: que tenha a capacidade de reproduzir nos limites estabelecidos em um sistema estável, os valores de uma medição realizada, em condições idênticas, assegurando o conhecimento da evolução do desempenho do processo.
d) **Confiável**: é a capacidade de ser verdadeiro e preciso, condições difíceis de serem obtidas em avaliações subjetivas, que dependem da percepção do analista.

Existem três conceitos de especificações que ajudam a estabelecer os indicadores da qualidade:

a) Característica do produto ou necessidade do paciente.
b) Característica do desempenho do produto para atender às necessidades do paciente.
c) Característica do desempenho do processo.

Como consequência, os indicadores da qualidade são oriundos da mensuração dessas características, sendo que a primeira mede a satisfação ou insatisfação do paciente, a segunda mede o desempenho dos produtos, e a terceira mede o desempenho dos processos de obtenção. Nesta última característica estão incluídos, além do desempenho global, o desempenho dos recursos humanos, o serviço de apoio, dos fornecedores, da comunidade e da sociedade como um todo.

As metodologias de medição utilizadas para estabelecer as metas dos indicadores da qualidade podem ser:

a) Processo de comparação em tempo real de funcionamento, com as especificações de excelência, estabelecidas pelo próprio laboratório ou em comparação com outras características do mercado, concorrentes ou necessidades dos pacientes.
b) Processo de projeção (média, desvio-padrão, média acumulada etc.).
c) Processo de previsão (projeção + previsão).

Todos os indicadores da qualidade devem estar expressos em uma unidade, e sendo ela utilizada para a verificação de desempenho e avaliação de melhoria contínua, a melhor unidade é em percentual (%), que permite comparar o estado atual com a melhoria a ser implementada no serviço. Portanto, gráficos como os de Pareto, de Ishikawa, de dispersão ou similares fornecem uma visão rápida para a avaliação dos indicadores da qualidade, aplicados aos laboratórios clínicos.

Para planejar a implantação de indicadores da qualidade em um laboratório clínico podemos utilizar as seguintes fases:

- **Preparação**: criar cultura e clima adequados na empresa, formar equipes, estabelecer metas, e planejar contatos com os pacientes.
- **Identificação das características, indicadores e metas**: realizar pesquisas, traduzir necessidades e expectativas, desenvolver e desdobrar indicadores, selecionando os mais importantes.
- **Sistema de informação**: identificar as fontes de dados, eliminar indicadores inviáveis, desenvolver metodologias, verificar consistência do sistema.
- **Medição e análise de dados e resultados**: coletar, processar e analisar os dados e resultados, procurar reduzir o ciclo, analisar criticamente, tomar decisões, utilizar no planejamento e medir o uso dos dados e resultados.
- **Avaliação e melhoria**: avaliar o uso dos indicadores e aprimorar o sistema quando necessário.

Nos laboratórios clínicos os indicadores da qualidade deverão conter, no mínimo, os seguintes itens, sem necessariamente se restringir a eles:

a) Desempenho dos controles interno e externo da qualidade.
b) Avaliação da satisfação do paciente (atendimento, qualidade, liberação e entrega do laudo).
c) Avaliação da satisfação do paciente médico (atendimento, qualidade, liberação e entrega do laudo).
d) Desempenho do setor de coleta de material.
e) Avaliação da qualidade da amostra.
f) Desempenho dos processos de dosagens.
g) Mensuração das não conformidades.
h) Tempo de permanência da amostra no laboratório até a liberação do laudo.
i) Amostras insatisfatórias ou incorretas por falta da preparação padronizada do paciente.
j) Cadastramento incompleto do paciente.
k) Recusa das amostras por não cumprimento das especificações.
l) Falta de reagentes por deficiência do setor de compras.
m) Pane nos equipamentos.
n) Erros de transcrição nos laudos.
o) Tempo de disponibilização dos resultados dos exames de rotina e urgentes.
p) Emissão de um segundo laudo por extravio do primeiro.
q) Repetições de exames e suas causas.

SISTEMA DE GESTÃO DA QUALIDADE

O Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) é uma estrutura organizacional criada para gerir e garantir a qualidade, os recursos necessários, os procedimentos operacionais e as responsabilidades estabelecidas.

O SGQ deve ser documentado e formalizado segundo o Manual da Qualidade (MQ), devendo incluir claramente os elementos que identifiquem a forma de gestão que possa ter influência na Qualidade do serviço oferecido.

Todos os documentos do SGQ devem ser organizados e controlados obedecendo a uma hierarquia.

1º nível: **MQ - Manual da Qualidade:**
É o documento básico do SGQ, deve conter a política da qualidade, determinar os requisitos à serem cumpridos de acordo com a norma de referência e descrever toda a documentação do sistema.

2º Nível: **PQ - Procedimentos da Qualidade:**
São os documentos do 2º nível da hierarquia dos documentos e devem descrever como são realizadas as atividades. Devem relatar o que se faz e como se faz.

3º Nível: **IT - Instruções de Trabalho:**
São documentos com um nível de detalhamento maior. Devem estar disponíveis nos locais em que a tarefa é executada.

DC - Descrição de Cargos:
É o documentos que descreve os cargos e funções dos colaboradores.

FR - Formulários de Registro:
Anexos
São os documentos que registram os dados que evidenciam as atividades realizadas.

ACREDITAÇÃO

Acreditar significa dar crédito, crer, ter como verdadeiro, dar ou estabelecer crédito.

Acreditação significa outorgar a uma organização um certificado de avaliação que expressa a conformidade com um conjunto de requisitos previamente estabelecidos.

Portanto, a Acreditação do Sistema da Qualidade de Laboratórios Clínicos é um processo periódico e voluntário, outorgado por entidades credenciadas, com a finalidade de comprovar a implementação do seu sistema da qualidade, quer seja em relação à capacidade organizacional ou técnica. No Brasil existem três entidades reconhecidas pela Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS) para realizar a acreditação de laboratórios, que são:

- **DICQ**: Sistema Nacional de Acreditação patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises clínicas (SBAC).
- **PALC**: Programa de Acreditação de laboratórios Clínicos patrocinado pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC).
- **ONA**: Organização Nacional de Acreditação.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Abol J C - Garantia da qualidade no laboratório clínico, 5ªed, 2015-2016
2. Barth J H – Clinical quality indicators in laboratory medicine: a survey of current practice in the UK. Ann Clin Biochem. 2011;48(3): 238-40
3. Fernandes Espina C, Mazziotta D – Gestión de la calidad em el Laboratorio Clinico, 1ª ed, 2005
4. Fraser C Z - Biological variation from principles to practice, AACC Press 2001
5. Guder W.G, Narayanan S, Wisser H. Samples: From the patient tyo the laboratory. The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results. Darmstadt, Cit Verlag GMBH, 2. ed.,2001.
6. Henry J B - Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais, 19ª edição, 1999.
7. Plebani M - The detection and prevention of errors in laboratory medicine. Ann Clin Biochen 2010;47:101-10
8. Ricós C, Garcia-Victoria M, de la FUENTE B – Quality indicators and specification for the extra-analytical phases in clinical laboratory management. Clin Chem Lab Med.. 2004;42(6):578-82.
9. The Journal of International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, v. 14, nº1.
10. Wallach Jacques, M.D. Interpretação de Exames Laboratoriais. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
11. Westgard J O - Westgard QC Home page (www.westgard.com)
12. Young D S (ed) – Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. 4ª ed, AACC Press, Washington, 1997

PARTE

3

Bioquímica

Mauren Isfer Anghebem

3

capítulo

Valter Teixeira da Motta

Desequilíbrio Acidobásico

CONCEITOS FISIOLÓGICOS FUNDAMENTAIS

A compreensão dos desequilíbrios acidobásicos requer o conhecimento de definições e princípios fundamentais, que enfatizam esses processos fisiológicos.

Ácidos são substâncias que podem doar íons hidrogênio (H^+), e bases são substâncias que podem aceitar íons H^+, independentemente da carga da substância.

$$H_2CO_3 \text{ (ácido)} \leftrightarrow H^+ + HCO_3^- \text{ (base)} \quad \text{(Reação 1)}$$

Ácidos fortes são aqueles que estão completamente ionizados, e ácidos fracos são os que estão parcialmente ionizados.

$$HCl \leftrightarrow H^+ + Cl^-$$

Ácido clorídrico (HCl) é considerado um ácido forte porque está presente somente na forma ionizada no organismo, enquanto o H_2CO_3 é um ácido fraco, porque está ionizado parcialmente e, no equilíbrio, os três reagentes estão presentes.

A lei da ação das massas estabelece que a velocidade da reação é proporcional ao produto da concentração dos reagentes. Com base nesta lei, a adição de H^+ ou bicarbonato impulsiona a reação 1 para a esquerda.

Em condições fisiológicas normais, a concentração de íons hidrogênio ($[H^+]$) nos líquidos do corpo é mantida em limites bastante estreitos em cerca de 40 nEq/L. A concentração do bicarbonato (24 mEq/L) é 600 mil vezes aquela do $[H^+]$. A regulação rígida de $[H^+]$ em baixos teores é crucial para as atividades normais da célula porque H^+ em altas concentrações liga-se fortemente às cargas negativas das proteínas, incluindo enzimas, impedindo o seu funcionamento. Sob condições normais, ácidos e, em menor extensão, bases são adicionadas constantemente ao compartimento extracelular, e para que o corpo mantenha a concentração fisiológica de H^+ de 40 nEq/L, três processos são realizados:

- Tamponamento por tampões extracelulares e intracelulares.
- Ventilação alveolar que controla a $PaCO_2$.
- Excreção renal que controla o bicarbonato plasmático.

TAMPÕES

Tampões são ácidos ou bases fracas que são capazes de minimizar alterações no pH por captar ou liberar H^+. Fosfato é um exemplo de um tampão efetivo, como na reação:

$$HPO_4^{2-} + H^+ \leftrightarrow H_2PO_4^-$$

Com a adição de H^+ ao líquido extracelular, o monoidrogeno fosfato liga o H^+ para formar o di-hidrogenofosfato, minimizando a alteração no pH. Do mesmo modo, quando $[H^+]$ está reduzida, a reação se desloca para a esquerda. Assim, os tampões trabalham como uma defesa de primeira linha para evitar alterações no pH que, caso contrário, poderia resultar da constante adição diária de ácidos e bases aos líquidos do corpo.

Sistema tampão HCO_3^-/H_2CO_3

O principal sistema tampão extracelular é o HCO_3^-/H_2CO_3 cuja função é ilustrada pelas reações:

$$H_2O + CO_2 \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$$

Os componentes da reação tornam o sistema altamente efetivo pela capacidade de controlar a $PaCO_2$ por alterações na ventilação. O aumento do teor de dióxido de carbono (CO_2) impulsiona para a esquerda a reação. De modo simplificado, a adição de um ácido (H^+) aos líquidos do corpo resulta no consumo de HCO_3^- e formação de ácido carbônico; o ácido carbônico, por sua vez, forma água e CO_2. A concentração de CO_2 é mantida em níveis estreitos, via respiração, que elimina o CO_2 acumulado. Os rins regeneram o HCO_3^- consumido durante a reação.

A reação continua orientada para a esquerda enquanto o CO_2 é eliminado ou até que HCO_3^- seja significativamente exaurido, produzindo menos HCO_3^- disponível para ligar H^+. Como o HCO_3^- e a $PaCO_2$ podem ser manejados independentemente (rins e pulmões, respectivamente) tornam esse sistema-tampão altamente efetivo. No equilíbrio, a relação entre os três reagentes da reação é expressa pela equação de Henderson-Hasselbalch, que relacionam a concentração do

CO_2 dissolvido (ou seja, H_2CO_3) à pressão parcial de CO_2 ($03 \times PaCO_2$) do seguinte modo:

$$pH = 6{,}10 + \log \frac{[HCO_3^-]}{0{,}03 \times PaCO_2}$$

Alternativamente:

$$[h+] = 24 \times \frac{PaCO_2}{[HCO_3^-]}$$

Notar que as alterações no pH ou $[H^+]$ são o resultado das modificações relativas na razão do $PaCO_2$ ao HCO_3^-, em lugar da alteração absoluta de qualquer um. Em outras palavras, se tanto a $PaCO_2$ e o HCO_3^- mudam na mesma direção, a razão permanece a mesma e o pH ou $[H^+]$ permanece relativamente estável. Para reduzir a alteração no pH quando tanto o HCO_3^- ou $PaCO_2$ alteram seus teores, o organismo, dentro de certos limites, modifica a outra variável na mesma direção.

Na acidose metabólica crônica os tampões intracelulares (ex.: hemoglobina, osso) podem ser mais importantes que o HCO_3^- nos casos em que o HCO_3^- extracelular é baixo.

Manuseio do ácido renal

Ácidos são adicionados constantemente aos líquidos corporais. Isso inclui ácidos voláteis (ex.: carbônico) e não voláteis (ex.: sulfúrico, fosfórico). O metabolismo dos carboidratos e gorduras da dieta produz aproximadamente 15 mil mmol de CO_2 por dia, que é excretado pelos pulmões. Obstáculos na execução dessa ação resultam em acidose respiratória.

O metabolismo das proteínas (ex.: aminoácidos contendo enxofre) e fosfatos da dieta formam ácidos não voláteis, H_2SO_4 e H_3PO_4. Esses ácidos são inicialmente tamponados pelo sistema HCO_3^-/H_2CO_3 como segue:

$$H_2SO_4 + 2\,NaHCO_3 \leftrightarrow Na_2SO_4 + 2H_2CO_3 \leftrightarrow 2H_2O + CO_2$$

O resultado líquido é o tamponamento de um ácido forte (H_2SO_4) por duas moléculas de HCO_3^- e a produção de um ácido fraco (H_2CO_3), que minimiza as alterações de pH. Os pulmões excretam o CO_2 produzido, e os rins, para prevenir a progressiva perda de HCO_3^- e acidose metabólica, substituem o HCO_3^- consumido (principalmente pela secreção de H^+ no ducto coletor). Alguns aminoácidos (ex.: glutamato, aspartato) formam citrato e lactato, que, por sua vez, serão convertidos em HCO_3^-. O resultado líquido é uma carga de 50 a 100 mEq de H^+ por dia.

Para manter o pH na faixa normal, os rins realizam duas funções fisiológicas. A primeira é a reabsorção do HCO_3^- filtrado (qualquer perda deHCO_3^- é igual a adição de uma quantidade equimolar de H^+), uma função do túbulo proximal. A segunda é a excreção da carga diária de H^+ (a perda de H^+ é igual a adição de quantidade equimolar de HCO_3^-), função do tubo coletor.

Reabsorção do HCO_3^-

Um indivíduo saudável, com concentração sérica do HCO_3^- de 24 mEq/L e ultrafiltrado glomerular diário de 180 L contém 4.300 mEq de HCO_3^-, que será todo reabsorvido. Aproximadamente, 90% do HCO_3^- filtrado é reabsorvido no túbulo proximal, e o restante é reabsorvido na alça ascendente e no ducto coletor.

A $3Na^+$-$2K^+$/ATPase (sódio-potássio trifosfatase) fornece a energia para o processo, que mantém a concentração do Na^+ intracelular baixo e um relativo potencial intracelular negativo. A baixa concentração do Na^+ indiretamente fornece a energia para a troca Na^+/H^+ apical, NHE3 (símbolo do gene SLC9A3), que transporta H^+ para o interior do lúmen. O H^+ no lúmen tubular combina com o HCO_3^- filtrado na reação:

$$HCO_3^- + H^+ \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H_2O + CO_2$$

A anidrase carbônica (isoforma CA IV), presente na borda em escova dos primeiros dois segmentos do túbulo proximal acelera a dissociação do H_2CO_3 em $H_2O + CO_2$, que desloca a reação para a direita e mantém a concentração luminal de H^+ baixa. O CO_2 difunde para a célula tubular proximal provavelmente via canal aquoso aquaporina-1, onde a anidrase carbônica (isoforma CA II) combina o CO_2 e água para formar HCO_3^- e H^+. O HCO_3^- produzido intracelularmente retorna ao espaço pericelular e, então, para a circulação via cotransporte $Na^+/3HCO_3^-$ basolateral, NBCe1-A (símbolo do gene *SLC4A4*).

Em essência, o HCO_3^- filtrado é convertido a CO_2 no lúmen, que difunde para a célula tubular proximal e, então, é reconvertido a HCO_3^- para retornar à circulação sistêmica e, assim, recuperar o HCO_3^- filtrado.

Excreção ácida

A excreção da carga ácida diária (50 a 100 mEq de H^+) ocorre principalmente pela secreção de H^+ pela H^+/ATPase apical nas células intercaladas α dos tubos coletores.

O HCO_3^- formado intracelularmente retorna para a circulação sistêmica via Cl^-/HCO_3^-, o AE1 (símbolo do gene *SLC4A1*) e o H^+ entram no lúmen tubular via bombas de prótons 1 para 2 apical, H^+/ATPase ou H^+-K^+/ATPase. A secreção de H^+ nesses segmentos é influenciada pela reabsorção de Na^+ nas células principais adjacentes ao tubo coletor. O Na^+ reabsorvido cria uma negatividade relativa no lúmen, que decresce a quantidade de H^+ secretada e difunde de volta ao lúmen.

Os íons hidrogênio secretados pelos rins podem ser excretados como íons livres, entretanto, em pH urinário 5 (igual à concentração de 10 μEq/L de H^+ livre), exigiria a excreção de 5.000 a 10.000 L de urina por dia. O pH urinário não pode diminuir muito abaixo de 5,0 porque o gradiente contra a bomba de prótons H^+/ATPase (pH 7,5 intracelular para o pH 5,0 luminal) torna-se muito abrupto. Uma urina acidificada ao máximo, mesmo com um volume de 3 L diá-

rios poderia conter somente 30 μEq de H^+ livre. No entanto, mais que 99,9% da carga de H^+ é excretada tamponada pelas bases fracas NH_3 ou fosfato.

Acidez titulável

A quantidade de H^+ secretado tamponado por ácidos fracos filtrados é chamada acidez titulável. O fosfato como HPO_4^{2-} é o principal tampão nesse sistema.

$$H_2PO_4 \leftrightarrow H^+ + HPO_4^{2-}$$

A quantidade de fosfato filtrado é limitada e relativamente fixa, portanto, somente uma fração do H^+ secretado pode ser tamponada pelo HPO_4^{2-}. Outros tampões urinários incluem o ácido úrico e a creatinina.

Amônia

O segundo mais importante sistema de tamponamento urinário para o H^+ secretado é a utilização da amônia (NH_3) como tampão:

$$NH_3 + H^+ \leftrightarrow NH_4^+$$

A amônia é produzida no túbulo proximal a partir do aminoácido glutamina em reação acelerada pela carga ácida e hipocalemia. Amônia é convertida em íon amônio (NH_4^+) pelo H^+ intracelular, e é secretada no lúmen tubular proximal pelo antiporte $Na^+H^+(NH_4^+)$ apical.

O contratransportador $Na^+/K^+(NH_4^+)/2Cl^-$ apical no ramo ascendente da alça de Henle então transporta NH_4^+ para o interstício medular, onde é dissociado em NH_3 e H^+. O NH_3 entra nas células epiteliais do ducto coletor via transportadores basolaterais de amônia, RhBG e RhCG, e então é transportado para o lúmen do ducto coletor via RhCG apical, onde está disponível para tamponar íons H^+ e tornar-se NH_4^+. O NH_4^+ é captado no lúmen e excretado como sal de Cl, e cada íon H^+ tamponado é um HCO_3^- ganho para a circulação sistêmica.

O aumento da secreção de H^+ no ducto coletor desvia a equação para a direita e reduz a concentração de NH_3, facilitando a difusão continuada de NH_3 do interstício, reduz seu gradiente de concentração no lúmen do ducto coletor, permitindo que mais H^+ seja tamponado. Os rins podem ajustar a quantidade de NH_3 sintetizada para atingir a demanda, tornando-a num poderoso sistema para tamponar o H^+ secretado na urina.

Ânions indeterminados (AI)

O plasma, como qualquer outro compartimento líquido do corpo, é neutro. A carga elétrica dos ânions é igual à dos cátions. O principal cátion é o Na^+ e os principais ânions no plasma são o Cl^- e o HCO_3^-. Ânions extracelulares presentes em baixas concentrações incluem fosfato, sulfato e alguns ânions orgânicos, enquanto os cátions presentes incluem K^+, Mg^{2+} e Ca^{2+}. Os ânions indeterminados (AI) são calculados pela diferença entre a concentração do Na^+ e dos ânions Cl^- e HCO_3^-. Aumentos dos AI resultam tanto da redução dos cátions não medidos (ex.: hipocalemia, hipocalcemia, hipomagnesemia) como de aumentos em ânions não medidos (ex.: hiperfosfatemia, teores elevados de albumina). Em certas formas de acidose metabólica, outros ânions se acumulam; o aumento de AI pode sugerir um diagnóstico diferencial para a causa da acidose.

$$HA + NaHCO_3 \leftrightarrow NaA + H_2CO_3 \leftrightarrow CO_2 + H_2O$$

A reação indica que a adição de ácido (HA, onde H^+ está combinado com um ânion não medido) resulta no consumo de HCO_3^-; a adição de ânions contribuirá para o aumento dos AI. Por exemplo, a acidose metabólica é assim classificada com AI normais (também chamada acidose metabólica hiperclorêmica) e acidose metabólica com AI altos.

Ânions indeterminados urinários

O cálculo do AI urinário colabora na avaliação de alguns casos de acidose metabólica não AI. Os principais cátions urinários medidos são o Na^+ e K^+, e o principal ânion é o Cl^-.

$$\text{AI urinários} = ([Na^+] + [K^+]) - [Cl^-]$$

Os principais ânions e cátions urinários não medidos são o HCO_3^- e NH_4^+, respectivamente. A excreção do HCO_3^- em indivíduos saudáveis é geralmente negligenciável, e a média de excreção diária de NH_4^+ é de aproximadamente 40 mEq/L, que resulta em AI positivo ou perto de zero. Na acidose metabólica os rins aumentam a quantidade de NH_3 sintetizada para tamponar o excesso de H^+ e a quantidade de NH_4Cl aumenta. A elevação de NH_4^+ não medido aumenta a medida do Cl^- na urina, e o efeito líquido é um AI negativo, representando uma resposta normal à acidificação sistêmica. Assim, o achado de um AI positivo na urina diante da acidose metabólica não AI direciona para um defeito da acidificação renal (ex.: acidose tubular renal [RTA]).

Ressalva no cálculo dos AI urinários

A presença de cetonúria torna esse teste sem sentido, pois a carga negativa das cetonas não é medida e os AI urinários serão positivos ou zero, apesar da acidificação renal e os níveis de NH_4^+ estarem aumentados. Além disso, redução severa do volume de perda de $NaHCO_3$ extrarrenal causa reabsorção proximal de Na^+, com pequena quantidade de Na^+ chegando ao lúmen do tubo coletor para ser reabsorvido em troca pelo H^+. A limitada excreção de H^+ reduz a excreção de NH_4^+ e pode tornar os AI urinários positivos.

Potássio e secreção ácida renal

A secreção ácida renal é influenciada pelo K^+ sérico. Pode resultar do deslocamento transcelular do K^+ quando o K^+ intracelular é trocado pelo H^+ extracelular ou vice-versa. Na hipocalemia pode se desenvolver uma acidose intracelu-

lar; na hipercalemia, uma alcalose intracelular é possível. A reabsorção do HCO_3^- está secundariamente aumentada para compensar a acidose intracelular. O aumento da concentração de H^+ intracelular promove a atividade da Na^+/H^+ apical (que troca o H^+ pelo Na^+).

A produção renal de NH_3 está elevada na hipocalemia, resultando em aumento na excreção ácida renal. O aumento na produção de NH_3 pelos rins pode ser significantemente suficiente para precipitar encefalopatia hepática em pacientes com doença hepática avançada. A correção da hipocalemia pode reverter esse processo.

Pacientes com hipocalemia podem ter urina relativamente alcalina porque a hipocalemia aumenta a amoniogênese renal. O excesso de NH_3 então liga mais H^+ no lúmen do néfron distal e o pH urinário aumenta. O que sugere RTA como etiologia de acidose com AI normais. Entretanto, essas condições são esclarecidas pela medida dos AI urinários, que será negativo em pacientes com excreção de NH_4^+ urinário e positivo em pacientes com RTA. A causa mais comum de hipocalemia e acidose metabólica é a perda gastrintestinal (ex.: diarreia, uso de laxantes). Outras etiologias menos comuns incluem perda renal de potássio secundária ao RTA ou nefropatia perdedora de sal. O pH urinário, o AI urinário e a concentração de K^+ urinário podem diferenciar essas condições.

Hipercalemia tem efeitos sobre a regulação ácido-base oposto àquele observado na hipocalemia. Hipercalemia impede a excreção de NH_4^+ pela redução da síntese de NH_3 no túbulo proximal e redução da reabsorção de NH_4^+ no ramo ascendente, resultando em redução intersticial medular da concentração de NH_3. Isso leva a uma redução na secreção ácida renal líquida, e é uma característica clássica de hipoaldosteronismo primário e secundário. Consistente com o papel central da hipercalemia na geração de acidose, a redução do teor de K^+ sérico pode corrigir a acidose metabólica associada.

Gasometria arterial

Artérias são vasos que transportam o sangue oxigenado do coração para os tecidos. A distribuição das artérias lembra uma árvore ramificada, cujo tronco comum é a aorta, que inicia no ventrículo esquerdo, enquanto as ramificações se estendem para as partes periféricas do corpo e órgãos.

Para os exames de gasometria arterial, o sangue é colhido da artéria radial ou, menos frequentemente, da artéria femoral ou branquial. Uma vez colhido o sangue arterial, devem ser eliminadas bolhas de gás visível para evitar que as mesmas se dissolvam e produzam resultados inexatos. A amostra é submetida ao analisador de gases.

Valores de referência ao nível do mar:

- Pressão parcial de oxigênio (PaO_2): 15 a 100 mmHg.
- Pressão parcial do dióxido de carbono ($PaCO_2$): 35 a 45 mmHg.
- pH do sangue arterial: 7,38 a 7,42.
- Saturação de oxigênio (SaO_2): 94% a 100%.
- Bicarbonato (HCO_3^-): 22 a 26 mEq/L.

Muitas vezes são determinadas concomitantemente as concentrações de lactato, hemoglobina, eletrólitos, oxi-hemoglobina, carboxi-hemoglobina e meta-hemoglobina.

ACIDOSE METABÓLICA

A acidose metabólica é um distúrbio clínico caracterizado pelo aumento na acidez do plasma. É considerada um sinal de uma doença subjacente. A identificação da condição subjacente é essencial para o início de terapia.

A acidose metabólica é classificada como tendo ânions indeterminados (AI) normais, e com ânions indeterminados altos. A acidose com AI normais é caracterizada por hipercloremia, às vezes também chamada acidose hiperclorêmica.

Acidose metabólica com ânions indeterminados normais (acidose hiperclorêmica)

A acidose metabólica AI normais pode ocorrer principalmente quando houver a perda de HCO_3^- pelo trato gastrintestinal, pelos rins ou por defeitos na acidificação renal. Alguns mecanismos que resultam nessa acidose são:

- **Perda renal de HCO_3^-.** Acidose tubular renal proximal (tipo 2). Terapia com inibidores da anidrase carbônica.
- **Perda de HCO_3^- pelo trato gastrintestinal.** Diarreia.
- **Fístula enterocutânea** (ex.: pancreática). Transplante de pâncreas com drenagem da bexiga.
- **Secreção renal insuficiente de H^+.** Acidose tubular renal distal (tipo 1). Acidose tubular renal hipercalêmica (tipo 4). Insuficiência renal.
- **Infusão ácida.** Cloreto de amônio. Hiperalimentação.
- **Expansão rápida de volume com salina isotônica.** Aumenta o teor de cloretos que excede a capacidade de gerar iguais quantidades de HCO_3^-.

As causas de acidose metabólica com ânions indeterminados altos são:

- **Acidose lática (acúmulo de ácido lático).** L-Latato, D-lactato.
- **Cetoacidose.** β-hidroxibutirato, acetoacetato.
- **Insuficiência renal crônica.** Sulfato. Fosfato, urato e hipurato.
- **Ingestão.** Salicilatos, metanol ou formaldeído (formato), etilenoglicol (glicolato, oxalato), paraldeído (ânions orgânicos), fenformina/metformina.
- **Acidemia piroglutâmico.** 5-Oxoprolinemia.
- **Rabdomiólise massivo.** Liberação de H^+ e ânions orgânicos do músculo lesado.

Acidose metabólica com ânions indeterminados altos

Algumas condições que causam acidose metabólica com ânions normais são:

- **Acidose lática (acúmulo de ácido lático).** L-Latato, D-lactato.

- **Cetoacidose.** β-hidroxibutirato, acetoacetato.
- **Insuficiência renal crônica.** Sulfato, fosfato, urato e hipurato.
- **Ingestão.** Salicilatos, metanol ou formaldeído (formato), etilenoglicol (glicolato, oxalato), paraldeído (ânions orgânicos), fenformina/metformina.
- **Acidemia piroglutâmico.** 5-Oxoprolinemia.
- **Rabdomiólise massiva.** Liberação de H^+ e ânions orgânicos do músculo lesado.

Compensação da acidose metabólica

O mecanismo de compensação da acidose metabólica é a hiperventilação. A redução do pH do sangue estimula os centros respiratórios e a hiperpneia resultante excreta o excesso de CO_2 do organismo. A compensação respiratória raramente é completa na acidose respiratória. Pacientes com função renal normal aumentam a excreção do ácido na forma de fosfato.

Diagnóstico laboratorial

Acidose metabólica se caracteriza por redução do bicarbonato plasmático e do pH sanguíneo. Nas formas agudas, a hiperventilação compensatória tende a normalizar o pH sanguíneo. Encontra-se, na maioria dos casos, hiperpotassemia devido à troca com H^+ extracelular para manter a eletroneutralidade.

■ ACIDOSE RESPIRATÓRIA

A acidose respiratória se caracteriza pela incapacidade dos pulmões em eliminar CO_2 devido à hipoventilação. Assim, a $PaCO_2$ aumenta e, se o nível de bicarbonato persistir dentro de faixas normais, ocorre redução da razão bicarbonato/ácido carbônico com baixa do pH.

A acidose respiratória é causada por uma redução da ventilação alveolar, que traz consigo um aumento do conteúdo plasmático de CO_2 e, como consequência, de H_2CO_3. Na fase aguda (antes da compensação renal) o ácido formado é neutralizado por tampões celulares, pela hemoglobina e por proteínas.

Como resultado da ação tamponante, aumenta o bicarbonato plasmático em aproximadamente 1,0 mmol/L a cada 10 mmHg de elevação da $PaCO_2$.

O aumento persistente da $PaCO_2$ desencadeia, lentamente, mas com eficiência, uma compensação renal. Assim, os rins eliminam mais H+ e retêm bicarbonato. Por exemplo: nos aumentos da $PaCO_2$ em 10 mmHg, a redução de bicarbonato plasmático será de, aproximadamente, 3 mmol/L. Desse modo, se a $PaCO_2$ permanece elevada em 70 mmHg, o bicarbonato aumenta para 33 mmol/L e o pH atinge 7,30. Portanto, o mecanismo de compensação é muito eficiente, considerando o pH na fase aguda.

Causas da acidose respiratória

- Doença pulmonar obstrutiva crônica é a causa mais comum e ocorre: bronquite crônica, enfisema, asma grave e edema pulmonar agudo (raro).
- Distúrbios neuromusculares. Miastenia grave, poliomielite, esclerose lateral amiotrófica, alguns antibióticos com atividade curariforme, tétano, paralisia do diafragma, distrofia muscular e síndrome de Guillain-Barré.
- Desordens do sono. Apneia do sono.
- Obesidade intensa (síndrome de Pickwick).
- Depressão do SNC. Fármacos: narcóticos, benzodiazepínicos e outros depressores.
- Desordens neurológicas. Encefalite e trauma.
- Hipoventilação alveolar primária.
- Estados comatosos. O acidente vascular cerebral por hemorragia intracraniana.

Compensação da acidose respiratória

Fase aguda

Durante os primeiros 10 minutos do aumento da $PaCO_2$ sanguínea ocorre uma elevação de 2 a 4 mmol/L no bicarbonato plasmático. Esse aumento eleva os valores de bicarbonato acima dos limites de referência e é devido ao aumento do conteúdo de CO_2, que desloca a reação para a direita:

$$H_2O + CO_2 \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$$

Ocorre principalmente nos eritrócitos, onde o excesso de íons hidrogênio é tamponado pela hemoglobina, e o bicarbonato permanece em solução.

Fase crônica

O aumento da $PaCO_2$ e do pH estimula o rim a secretar íons hidrogênio, e durante o processo o bicarbonato é regenerado. Entre dois e quatro dias é atingido o maior nível de bicarbonato (aproximadamente 45 mmol/L) na acidose respiratória não complicada.

Diagnóstico laboratorial

Os achados característicos da acidose respiratória são a elevação da $PaCO_2$ (> 47 mmHg) com redução do pH, que tende para a acidemia (pH < 7,35). A compensação renal pela reabsorção de bicarbonato é um processo lento na acidose respiratória aguda (em geral com pH e bicarbonato plasmático normais). Na acidose respiratória crônica (em geral com pH compensado pelo aumento do bicarbonato), a compensação renal é reconhecida pelo teor do bicarbonato plasmático. Alguns pacientes apresentam "hipercompensação", com o pH sanguíneo que se desloca até a alcalemia e certa perda de potássio. Deve-se ter em conta que um paciente previamente desconhecido, cuja análise de gases sanguíneos apresenta dados de acidose respiratória aguda (redução do pH, elevação da $PaCO_2$ e bicarbonato normal), na realidade pode esconder uma acidose respiratória crônica associada a qualquer causa possível de acidose metabólica, com tendência a normalizar o valor de bicarbonato, que deveria estar aumentado para compensar o transtorno crônico. Em tais casos, o cálculo dos ânions indeterminados pode resolver o problema diagnóstico.

ALCALOSE METABÓLICA

Alcalose metabólica é o aumento primário da concentração do bicarbonato. Isso ocorre como consequência da perda de ácido (H^+) do organismo ou do ganho de bicarbonato (HCO_3^-). Em sua forma pura, se manifesta como alcalemia (pH > 7,40). Como mecanismo de compensação, a acidose metabólica provoca hipoventilação alveolar, que aumenta a pressão de dióxido de carbono ($PaCO_2$), que reduz a elevação no pH.

Normalmente, a $PaCO_2$ arterial eleva cerca de 0,5 a 0,7 mmHg para cada 1 mEq/L de aumento na concentração do bicarbonato plasmático. Se a modificação não permanecer dentro desses limites, pode estar ocorrendo um distúrbio acidobásico misto. Por exemplo, se o aumento na $PaCO_2$ é maior que 0,7 vezes o aumento do bicarbonato, a alcalose metabólica coexiste com a acidose respiratória primária. Ademais, se o aumento na $PaCO_2$ é menor que a alteração esperada, então uma alcalose respiratória também está presente.

O primeiro indício de alcalose metabólica é o teor do bicarbonato elevado no sangue. No entanto, a concentração do bicarbonato elevada pode também ser observada como resposta compensatória à acidose respiratória primária. Entretanto, valores de bicarbonato acima de 35 mEq/L quase sempre têm como causa a alcalose metabólica.

A alcalose metabólica é diagnosticada pela medida dos eletrólitos séricos e pela gasometria arterial. Se a etiologia da alcalose metabólica não estiver esclarecida pela história clínica e pelo exame físico, incluindo o uso de medicamentos e a presença de hipertensão, deve ser determinada a concentração de cloretos na urina. O cálculo dos ânions indeterminados pode ajudar a diferenciar entre a alcalose metabólica primária e a compensação da acidose respiratória.

O tratamento da alcalose metabólica depende da etiologia subjacente e das condições de volume do paciente.

A alcalose metabólica é gerada por um dos seguintes mecanismos:

- **Perdas de íons hidrogênio.** Os íons hidrogênio podem ser perdidos pelos rins ou pelo trato gastrointestinal. Vômitos ou aspiração nasogástrica geram alcalose metabólica pela perda de secreções gástricas ricas em ácido clorídrico (HCl). Enquanto um íon hidrogênio é excretado, um íon bicarbonato é ganho no espaço extracelular. A depleção de volume mantém a alcalose. Perdas renais de íons hidrogênio ocorrem se a entrega distal de sódio aumenta em presença de excesso de aldosterona, que estimula o canal eletrogênico epitelial do sódio (ENaC) no tubo coletor. Nesse canal ocorre a absorção de íons sódio, o lúmen tubular torna-se mais negativo, levando a secreção de íons hidrogênio e íons potássio para o lúmen.
- **Deslocamento de íons hidrogênio para o espaço intracelular.** O deslocamento pode desenvolver hipocalemia. Como a concentração do potássio extracelular diminui, os íons potássio se movem para fora das células. Para manter a neutralidade, os íons hidrogênio se deslocam para o interior do espaço intracelular.
- **Administração de bicarbonato.** Administração de bicarbonato de sódio em quantidades que excedem a capacidade dos rins em excretar esse excesso de bicarbonato pode causar alcalose metabólica. Essa capacidade está reduzida quando existir redução do filtrado de bicarbonato, com o observado na insuficiência renal ou quando ocorre a reabsorção tubular aumentada de bicarbonato, como o observado na depleção de volume.
- **Perda de líquido extracelular pobre em bicarbonato e rico em cloretos.** Encontrada na administração de tiazida ou diuréticos de alça. Também presente na diarreia com cloretos, leva à contração de volume do líquido extracelular. Devido à quantidade de bicarbonato original estar agora dissolvida em menor volume do líquido, um aumento na concentração do bicarbonato ocorre. Esse aumento no bicarbonato causa, no mínimo, um aumento de 2 a 4 mEq/L na concentração do bicarbonato.

Manutenção da alcalose metabólica

A redução de perfusão dos rins, causada tanto pela depleção do volume quanto por redução no volume efetivo do sangue circulante (ex.: estados edematosos como a insuficiência cardíaca ou cirrose) estimula o sistema renina-angiotensina-aldosterona. Esse aumento da reabsorção renal do íon sódio através do néfron, incluindo as células principais de tubo coletor, resulta em aumento na secreção de íon hidrogênio via bomba próton apical H^+ adenosina trifosfatase nas células intercaladas adjacentes tipo A.

A aldosterona pode também, de forma independente, aumentar a atividade da bomba de próton apical. Quando o íon hidrogênio é secretado para o lúmen tubular, um íon bicarbonato é ganho no sistema circulatório via troca basolateral Cl^-/HCO_3^-.

A depleção de cloretos pode ocorrer no trato gastrointestinal pela perda de secreções gástricas, que são ricas em íons cloretos, ou por meio dos rins com tiazida ou diuréticos de alça. A depleção dos cloretos, mesmo sem depleção de volume, aumenta a reabsorção de bicarbonato por diferentes mecanismos.

No túbulo ascendente distal e túbulo distal estão presentes células especializadas chamadas máculas densas. Essas células têm um cotransportador $Na^+/K^+/Cl^-$ na membrana apical que é principalmente regulado por íons cloretos. Quando alguns íons cloretos atingem esses transportadores (ex.: depleção de cloretos), por sinais da mácula densa, o aparelho justaglomerular (ou seja, células especializadas na parede da arteríola aferente adjacente) para secretar renina, que aumenta a secreção de aldosterona via angiotensina II.

Na alcalemia os rins secretam o excesso de bicarbonato via trocador cloreto/bicarbonato apical nas células intercaladas tipo B do tubo coletor. Deste modo, prótons são adicionados a circulação sistêmica via H^+ ATPase basolateral. Na depleção de cloretos, poucos íons cloretos estão disponíveis para serem excretados com bicarbonato, e a capacidade dos rins para excretar o excesso de bicarbonato está prejudicada.

Muitas das causas da alcalose metabólica estão associadas com a hipocalemia. Por sua vez, a hipocalemia mantém a alcalose metabólica por cinco diferentes mecanismos.

1. A hipocalemia resulta no deslocamento de íons hidrogênio intracelularmente. A acidose intracelular resultante aumenta a reabsorção do bicarbonato no tubo coletor.
2. Provoca o estímulo da H^+/K^+ ATPase apical no tubo coletor. O aumento da atividade desta ATPase lida com a causa/efeito da absorção apropriada do íon potássio, mas a um correspondente de secreção de íon hidrogênio. Isto leva a um ganho líquido de bicarbonato, mantendo a alcalose sistêmica.
3. Estimula a gênese da amônia renal. Os íons amônio (NH_4^+) são produzidos no túbulo proximal a partir do metabolismo da glutamina. Durante esse processo, o αcetoglutarato é produzido, desencadeando o mecanismo pelo qual gera bicarbonato, que retorna para a circulação sistêmica.
4. Promove prejuízo na reabsorção do íon cloreto no néfron distal. Isto resulta em um aumento na eletronegatividade luminal, com subsequente aumento da secreção de íon hidrogênio.
5. Reduz a taxa de filtração glomerular (TFG). Estudos animais têm mostrado que a hipocalemia, por mecanismos desconhecidos, reduz a TFG, que diminui a carga de bicarbonato filtrado. Na presença de depleção de volume, isto deteriora a excreção renal do excesso de bicarbonato.

ALCALOSE RESPIRATÓRIA

A alcalose respiratória se caracteriza pela eliminação excessiva de CO_2 pelos pulmões. A redução da $PaCO_2$ (hipocapnia) com níveis normais de bicarbonato aumenta a razão bicarbonato/ácido carbônico (normal: 20:1), elevando o pH.

A alcalose respiratória é o resultado de um aumento da ventilação alveolar, com uma redução da $PaCO_2$. Na fase aguda, a redução dos ácidos voláteis circulantes requer a saída do H+ do compartimento celular para os líquidos extracelulares, onde combinam-se com o bicarbonato:

$$H_2O + CO_2 \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$$

A redução do bicarbonato é de aproximadamente 2 mmol/L para cada 10 mmHg de $PaCO_2$. Por exemplo, se a $PaCO_2$ é reduzida a 25 mmHg, o bicarbonato aumenta a 21 mmol/L e o pH eleva a 7,55. O mecanismo de tamponamento é bastante ineficiente, já que com um conteúdo de bicarbonato inalterado o pH se elevaria a um valor não superior a 7,60.

Na hipercapnia persistente sobrevém uma compensação renal em forma de redução de excreção urinária de H+ e de amônia além de aumento da eliminação de bicarbonato. No caso, uma redução da $PaCO_2$ de 10 mmHg reduzirá o bicarbonato plasmático em 5 mmol/L, com bom efeito compensatório sobre o pH sanguíneo.

Causas de alcalose respiratória

- Desordens pulmonares. Pneumonia, asma, embolia pulmonar, atelectasia, fibrose, doença vascular e pneumotórax.
- Desordens cardiovasculares. Insuficiência cardíaca congestiva, hipotensão e cianose de etiologia cardíaca.
- Desordens metabólicas. Acidose (diabética, renal ou láctica).
- Desordens do sistema nervoso central. Hiperventilação psicogênica ou induzida por ansiedade, infecção ou tumores do SNC, encefalites e meningites.
- Fármacos. Salicilatos, metilxantinas, agonistas α-adrenérgicos, nicotina e progesterona.
- Hipoxemia. Elevadas altitudes (baixos teores de oxigênio) e anemia severa.
- Outros. Febre, sepse, dor, insuficiência hepática, gravidez (a progesterona estimula o centro respiratório), hipertireoidismo, fase de compensação respiratória na correção da acidose metabólica.

Compensação na alcalose respiratória

A resposta compensatória da redução da $PaCO_2$ é uma diminuição do bicarbonato plasmático que ocorre em duas fases:

Fase aguda

Nos primeiros 10 minutos da diminuição da $PaCO_2$ há uma queda de 2 a 4 mmol/L do bicarbonato plasmático pelo deslocamento da reação para a esquerda:

$$H_2O + CO_2 \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$$

Como no caso da reação na acidose respiratória (ver acima), esta também ocorre, principalmente nos eritrócitos. A concentração do bicarbonato pode cair a 18 mmol/L, mas raramente abaixo desse valor.

Fase crônica

Após a queda aguda na concentração do bicarbonato, o valor do pH é mantido pela retenção dos íons hidrogênio pelo rim (a regeneração do bicarbonato é mais lenta que nos estados normais). Se esta condição persistir por sete ou mais dias, o nível de bicarbonato pode cair o suficiente para o pH retornar ao normal, ou seja, pode ocorrer a completa compensação. O teor de bicarbonato plasmático pode baixar até 12 a 14 mmol/L na alcalose respiratória não complicada.

Diagnóstico laboratorial da alcalose respiratória

O quadro característico consiste em redução da $PaCO_2$ (< 36 mmHg), que tende a elevar o pH sanguíneo até a alcalemia (> 7,44). Como na acidose respiratória, a compensação renal (em forma de redução do conteúdo de bicarbonato plasmático) é mais completa na forma crônica que na aguda.

O número aumentado de leucócitos indica sepse como uma das prováveis etiologias. Hematócrito reduzido indica anemia. Na insuficiência hepática as provas de função apresentam-se alteradas.

DISTÚRBIOS MISTOS DO EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE

Não é raro que um paciente sofra simultaneamente dois ou mais transtornos primários do equilíbrio ácido-base. Os efeitos sobre o pH do sangue podem ser somatórios, como na acidose metabólica e respiratória associadas, ou na alcalose metabólica e respiratória associadas. Em outros casos, os efeitos de transtornos coexistentes podem empurrar o pH em direções opostas para efetuar uma neutralização parcial ou completa, como na acidose metabólica associada a alcalose metabólica ou respiratória, e na alcalose metabólica associada com a acidose respiratória e metabólica.

Uma compreensão correta da compensação renal e respiratória, em termos de suas respectivas magnitudes, proporciona o diagnóstico exato de transtornos complexos do equilíbrio ácido-base.

Os transtornos mistos do equilíbrio ácido-base podem ser produzidos de várias formas, já que quaisquer das possíveis causas de acidose metabólica podem ser induzidas conjuntamente com qualquer causa de alcalose respiratória e acidose ou alcalose respiratória.

DIAGNÓSTICO DOS DESEQUILÍBRIOS ÁCIDO-BASE

Do ponto de vista laboratorial, os distúrbios ácido-base apresentam anormalidades em um ou mais dos seguintes testes:

- Avaliação dos gases sanguíneos.
- Ânions indeterminados no soro.
- Bicarbonato sérico.

É possível, mas infrequente, existir uma severa desordem ácido-base em um paciente, e os valores dos parâmetros acima se apresentarem normais. Essa ocorrência se dá em alguns casos de distúrbios mistos de acidose e alcalose metabólica, em que a acidose metabólica apresenta ânions indeterminados normais, por exemplo, no vômito severo (aumento do bicarbonato plasmático) em pacientes com acidose tubular renal não tratada (redução do bicarbonato plasmático sem elevação dos ânions indeterminados). Obviamente, essas ocorrências são raras, mas possibilitam enfatizar a importância do cuidadoso exame de todas as condições do paciente com distúrbios ácido-base.

Interpretação dos resultados da análise dos gases e pH

A interpretação dos resultados de gases sanguíneos é facilitada pelo conhecimento dos aspectos clínicos implicados. Mesmo assim, em alguns casos, a interpretação pode ser difícil. Normalmente, as avaliações dos transtornos ácido-base são realizadas a partir das determinações pH, $PaCO_2$ e PaO_2.

Avaliação da ventilação e do estado ácido-base

$PaCO_2$ arterial: 33 a 45 mmHg. A $PaCO_2$ é um parâmetro direto e sensível que expressa a ventilação alveolar.

Como a $PaCO_2$ é uma expressão da ventilação, pode-se afirmar que:

- Em $PaCO_2$ < 30 mmHg existe hiperventilação alveolar.
- Em $PaCO_2$ entre 30 e 45 mmHg existe uma ventilação normal.
- Em $PaCO_2$ > 45 mmHg existe insuficiência respiratória.

Assim, o valor da $PaCO_2$ oferece uma informação clara acerca da ventilação pulmonar.

- **pH arterial:** 7,36 a 7,42. Para diagnosticar qualquer transtorno do equilíbrio ácido-base é necessária a determinação do pH. A medição do pH do sangue informa se o paciente está normoacidêmico ou se sofre uma acidemia (pH < 7,36) ou alcalemia (pH > 7,42). No entanto, as medições do pH não permitem a expressão quantitativa dos transtornos metabólicos, pois a presença dos sistemas tampões impedem uma relação direta entre o transtorno primário e as leituras de pH. Sendo assim, a simples medição do pH não trará as informações acerca da natureza da causa primária responsável pelo transtorno observado. No entanto, a avaliação simultânea do pH e da $PaCO_2$ informarão se os transtornos primários são de natureza respiratória ou metabólica.
- **Interpretação do pH com $PaCO_2$ < 30 mmHg (hiperventilação alveolar).** Em $PaCO_2$ inferior a 30 mmHg pode-se avaliar as seguintes situações com respeito ao pH:
  - pH > 7,50: hiperventilação alveolar aguda. As variações do pH são secundárias a uma alteração da ventilação.
  - pH entre 7,40 e 7,50: hiperventilação alveolar crônica. É muito provável que tenha lugar uma compensação renal; a hiperventilação deve ter iniciado em menos de 24 horas.
  - pH entre 7,30 e 7,40: acidose metabólica compensada. Em presença de acidose metabólica primária, o sistema respiratório normalizou o pH do sangue criando uma situação de alcalose respiratória. É pouco provável que esse quadro represente uma hiperventilação alveolar primária, pois o rim teria hipercompensado.
  - pH < 7,30: acidose metabólica parcialmente compensada, que representa um transtorno de acidemia metabólica, ante a qual o sistema respiratório respondeu com hiperventilação alveolar, que demonstra ser ineficiente.
- **Interpretação do pH com $PaCO_2$ entre 30 e 45 mmHg (ventilação normal).** Com valores de $PaCO_2$ dentro dos limites da normalidade devem ser consideradas as seguintes situações do pH:
  - pH > 7,50: alcalose metabólica primária não compensada eficazmente pelo sistema respiratório.
  - pH entre 7,30 e 7,50: estados respiratórios e ácido-base compatíveis.

  - pH < 7,30: acidose metabólica não compensada pelo sistema respiratório.
- **Interpretação do pH com pCO_2 > 45 mmHg (insuficiência ventilatória).** Com valores de $PaCO_2$ superiores a 45 mmHg pode-se postular os seguintes transtornos do pH:
  - pH > 7,50: alcalose metabólica parcialmente compensada. Representa uma alcalose primária, incompletamente compensada pela hipoventilação alveolar.
  - pH < 7,30: insuficiência ventilatória aguda. Uma ventilação inadequada, com pH reduzido no sangue arterial, reflete com grande segurança um transtorno agudo da ventilação.
- **Anormalidades da PaO_2.** A caracterização da composição de oxigênio no sangue requer a medida de PaO_2, concentração da hemoglobina e a percentagem de saturação do oxigênio. As anormalidades nesses constituintes são:

  - Redução (ou aumento) na PaO_2 inspirada.
  - Hipoventilação.
  - Doença pulmonar.

A medida de PaO_2 no sangue arterial (valores de referência: 80 a 110 mmHg) é de grande valor na avaliação da respiração e na eficiência da terapia pelo oxigênio. Resultados das medidas de PaO_2 estão alterados quando a capacidade de transporte do oxigênio no sangue é afetada pela anemia, envenenamento por monóxido de carbono, e em presença de derivados de hemoglobinas (ex.: meta-hemoglobina).

A hipoxemia deve ser avaliada após uma exploração adequada da ventilação e do estado ácido-base do paciente. A medição direta da PaO_2 arterial indica a presença de hipoxemia tissular, mas não necessariamente a demonstra. É igualmente importante o fato de a hipoxemia, por si mesma, poder produzir transtornos respiratórios e ácido-base diversificados.

A hipoxemia arterial se define como a presença de valores de PaO_2 inferiores aos limites aceitáveis. Os graus de hipoxemia em pacientes com menos de 60 anos de idade e que respiram sem equipamentos são:

- Leve, com leituras de PaO_2 entre 80 e 60 mmHg.
- Moderada, com leituras de PaO_2 entre 60 e 40 mmHg.
- Intensa, com leituras de PaO_2 inferiores a 40 mmHg.

A saturação de oxigênio indica a quantidade de oxigênio ligado à hemoglobina e é determinada para avaliar a respiração ou a oxigenoterapia.

As principais causas de aumento dos valores da PaO_2 arterial são: a) respiração com ar enriquecido com O_2 – a administração de 100% de O_2, a PaO_2 pode chegar a valores acima de 600 mmHg; b) exercícios, tanto em indivíduos saudáveis como em pacientes cardíacos resultam em aumento dos valores existentes em repouso.

A hipoxemia arterial (redução da PaO_2 arterial) é geralmente uma emergência médica. Vários mecanismos podem ocorrer simultaneamente. As principais causas são:

- Diminuição da PaO_2 no ar inspirado pela baixa pressão em altas altitudes.
- Hipoventilação com aumento da $PaCO_2$ e redução alveolar da PaO_2. Hipoventilação de origem periférica é causada por sufocação, submersão, anormalidades esqueléticas ou trauma do tórax que dificulta a expansão completa, paralisia no nervo frênico, tétano, poliomielite aguda e síndrome de Pickwick. Hipoventilação de origem central é causada pela depressão do centro respiratório, por drogas como barbitúricos ou morfina.
- Redução da capacidade de difusão pulmonar de O_2, como na síndrome do sofrimento respiratório em adultos ou recém-nascidos, carcinomatose lifangítica, adenomatose pulmonar, sarcoidose, síndrome de Hamman-Rich, beriliose, hemosiderose pulmonar secundária a estenose mitral.
- Redução da área das membranas alveolocapilares como resultado de ressecamento ou compressão pulmonar.
- Ventilação irregular e perfusão do sistema cardiopulmonar por bronquites, asma, enfisema, bronquiectasias, atelectasias, pneumoconiose, granulomas, neoplasmas, infarto pulmonar, pneumonia, mucoviscidose ou obstrução das vias aéreas por neoplasma, corpo estranho ou secreções (ex.: difteria).
- Aumento do desvio do sangue do lado venoso para o lado arterial em razão de enfermidades cardíacas congênitas, pneumonia, atelectasia, edema pulmonar e choque.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Dzierba AL, Abraham P. A practical approach to understanding acid-base abnormalities in critical illness. J Pharm Pract. 2011;24(1):17-26.
2. Motta VT. Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações. 5.ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2009. p.181-94.
3. Reddy P, Mooradian AD. Clinical utility of anion gap in deciphering acid-base disorders. Int J Clin Pract. 2009;63(10):1516-25.

4

capítulo

Valter Teixeira da Motta

Equilíbrio Hidreletrolítico

ASPECTOS BÁSICOS DO METABOLISMO HIDRELETROLÍTICO

Nos mamíferos, a manutenção da pressão osmótica e a distribuição da água em compartimentos do corpo são mantidas, fundamentalmente, por quatro eletrólitos: sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-), e bicarbonato (HCO_3^-).

Os eletrólitos são classificados em *ânions* (íon com carga elétrica negativa) ou *cátion* (íon com carga elétrica positiva).

Apesar de aminoácidos e proteínas em solução também possuírem cargas elétricas são considerados separadamente. Os eletrólitos ocorrem basicamente como íons livres e suas concentrações são descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Concentrações de cátions e ânions no líquido extracelular (expressos em mmol/L).

Cátions		Ânions	
Na^+	142	Cl^-	103
K^+	4	HCO_3^-	27
Ca^{2+}	5	HPO_4^{2-}	2
Mg^{2+}	2	SO_4^2	1
Outros (traços)	1	Ácidos orgânicos$^-$	5
		Proteínas$^-$	16
Total	**154**		**154**

Fonte: Acervo do autor.

As necessidades dietéticas de eletrólitos variam amplamente; alguns são necessários somente em pequenas quantidades. Outros, como o cálcio, potássio e o fósforo são continuamente excretados e devem ser repostos regularmente para prevenir deficiências. A ingestão excessiva leva a um aumento correspondente na excreção, principalmente na urina. A perda anormal de eletrólitos como resultado de perspiração intensa, vômito ou diarreia é rapidamente detectada por testes laboratoriais e é corrigida pela administração oral ou parenteral de soluções salinas.

O papel dos eletrólitos no organismo vivo é bastante variado. Praticamente não existe nenhum processo metabólico que não seja dependente ou afetado pelos eletrólitos. Dentre as várias funções dos eletrólitos, se destacam a manutenção da pressão osmótica, homeostasia da água, pH fisiológico, funcionamento cardíaco e músculos. Participam em reações de oxidação-redução (transferência de elétrons), e na catálise como cofatores enzimáticos. Assim sendo, torna-se óbvio que níveis alterados dos eletrólitos podem ser a causa ou a consequência de várias desordens.

ÁGUA CORPÓREA E SEUS COMPARTIMENTOS

A água compõe 60% do peso corporal de um adulto. É essencial ao metabolismo intermediário e para as funções dos órgãos vitais. Tanto o equilíbrio da água no organismo como a sua distribuição entre os três compartimentos corpóreos – intracelular (interior das células), intersticial (espaço entre os tecidos) e intravascular (interior dos vasos sanguíneos) – são rigorosamente mantidos por mecanismos homeostáticos dentro de estreitos limites. A Tabela 4.2 mostra a distribuição de água em diferentes compartimentos em adultos.

Tabela 4.2 Porcentagem de água nos compartimentos do corpo humano de um adulto.

Líquido intracelular (LIC)	40%
Líquido extracelular (LEC)	20%
Líquido intersticial	15%
Líquido intravascular	5%
Total	**60%**

Fonte: Acervo do autor.

Sem a água, o corpo é incapaz de manter a vida. Cinco são as funções da água para manter o organismo saudável:

1. Transporte de nutrientes, eletrólitos e oxigênio para as células.

2. Remoção de produtos de excreção.
3. Regulação da temperatura corpórea.
4. Lubrificação de juntas e membranas.
5. Meio para a digestão de alimentos.

Quando a quantidade de água é insuficiente e os rins estão funcionando normalmente, o volume de urina diminui e a pessoa torna-se sedenta. Ao ingerir água, o déficit de líquido é corrigido. Em presença de excessiva ingestão de água, a quantidade de urina aumenta proporcionalmente. Fontes de fluidos ingeridos incluem líquidos, alimentos e produtos da oxidação de alimentos. A média de ingestão e excreção diária de líquidos é de 1.800 a 2.600 mL. O corpo humano perde líquidos diariamente pela urina, fezes, pulmões e pele (perspiração insensível). Cerca de 300 mL a 500 mL de líquidos são perdidos, como suor e atividade glandular. Na Tabela 4.3 estão listadas as quantidades de ingestão e perdas diárias de líquidos.

Pressão líquida (Lei de Starling)

O líquido extracelular (LEC) se desloca entre o espaço intravascular (vasos sanguíneos) e o espaço intersticial (tecidos) para manter o equilíbrio líquido no compartimento extracelular. Existem medidas que determinam o fluxo de líquido entre os espaços intravascular e intersticial. A pressão osmótica coloidal e a pressão hidrostática do sangue e dos tecidos influenciam o movimento do líquido através da membrana capilar. A troca líquida ocorre somente pelas paredes capilares e não pelas paredes de arteríolas ou vênulas. Assim, o líquido se move para o interior do espaço intersticial pelo capilar da terminação arteriolar e sai do espaço intersticial para o capilar pela terminação venular.

O líquido flui somente quando há uma diferença na pressão nas duas terminações do sistema. A diferença na pressão entre os dois pontos é conhecida como *gradiente de pressão*. Se a pressão em um terminal é 32 mmHg e na outra terminação 26 mmHg, o gradiente de pressão é 6 mmHg. Tanto o plasma nos capilares como os líquidos teciduais têm suas próprias pressões hidrostáticas e pressões osmóticas coloidais. A diferença de pressão entre a pressão osmótica coloidal plasmática e a pressão osmótica coloidal tecidual é conhecida como *gradiente de pressão osmótica coloidal*; do mesmo modo, a diferença entre a pressão hidrostática plasmática e a pressão hidrostática tecidual é conhecida como *gradiente de pressão hidrostática*.

Como a pressão hidrostática do plasma (18 mmHg) na terminação arteriolar do capilar é maior que a pressão hidrostática tecidual (–6 mmHg) no espaço tecidual, o líquido move-se para fora do capilar em direção ao espaço tecidual. A pressão osmótica coloidal plasmática (28 mmHg) na terminação venular do capilar é maior que a pressão coloidal osmótica tecidual (4 mmHg) no espaço tecidual, causando o movimento dos líquidos dos espaços teciduais para os capilares. Sem as forças coloidais osmóticas, o líquido é perdido pela circulação e permanece nos tecidos, causando inchação e edema.

Ingestão de água

A ingestão diária de água é variável e depende das perdas e de fatores psicológicos. A média de ingestão diária é de 2,5 L. O principal fator determinante da ingestão líquida é a sede, que está sob controle do centro da sede localizado no hipotálamo. O funcionamento normal desse centro é influenciado por: 1) *Tonicidade do LEC* (hipertonicidade aumenta a sede); 2) *Volume sanguíneo* (redução do volume aumenta a sede); 3) *Fatores diversos* (dor e estresse, por exemplo, aumentam a sede).

Excreção da água

O organismo está em equilíbrio aquoso quando a ingestão e a perda total de água corporal são aproximadamente iguais. Quantidades variáveis de líquido são perdidas pela pele (suor), e membranas mucosas (água livre de eletrólitos no ar expirado) o que depende da temperatura ambiente e da ventilação pulmonar. Uma pequena quantidade de água é perdida nas fezes (< 100 mL/d). A principal perda de água ocorre pelos rins.

Excreção renal de água

A cada dia, 130 a 180 litros de água são filtrados pelo glomérulo. Somente 1 a 2 litros são liberados como urina. Isso porque é realizada a reabsorção passiva de 70% a 80% no túbulo proximal (fluxo isosmótico de água obrigatório, consequente à reabsorção de sódio), e a reabsorção nos ductos coletores sob a influência do AVP (hormônio arginina

Tabela 4.3 Ingestão e perda líquida diária em adultos normais.

Ingestão líquida		Perda líquida	
Líquidos	1.000-1.200 mL	Urina	1.000-1.500 mL
Alimentação	800-1.000 mL	Fezes	100 mL
Oxidação	200-300 mL	Pulmões	400-500 mL
		Pele	300-500 mL
Total	**2.000-2.500 mL**	**Total**	**1.800-2.600 mL**

Fonte: Acervo do autor.

vasopressina). A produção e a excreção de AVP também são influenciadas pelos mecanismos que controlam a ingestão de água.

ÁGUA

Pela grande importância da água como constituinte corporal e seu papel no metabolismo intermediário é vital o reconhecimento de distúrbios que afetam a sua distribuição entre os compartimentos – intracelular, intersticial e intravascular.

Osmolalidade

É a concentração de solutos (expressas em mmol/L) por quilo de solvente. No plasma todas as partículas dissolvidas, como eletrólitos, carboidratos, produtos de excreção, vitaminas, fármacos e hormônios contribuem para a osmolalidade. No entanto, as principais contribuições são o sódio (cerca de 50% do total), cloretos, glicose, ureia, proteínas e álcool etílico (quando presente). A *osmolalidade urinária* é útil para a comparação com a osmolalidade plasmática na avaliação da regulação da água em relação ao controle hormonal e a função renal.

Osmometria

É o termo geral empregado para a análise da osmolalidade. As partículas dissolvidas afetam uma solução pela alteração das propriedades coligativas, como a redução da pressão de vapor ou diminuição do ponto de congelamento. Essas propriedades são utilizadas pelos *osmômetros* para determinar a osmolalidade tanto no plasma quanto na urina.

Valores aproximados da osmolalidade plasmática são obtidos pela fórmula (concentrações em mmol/L):

$$\text{Osmolalidade} = 2[Na^+] + 2[K^+] + [\text{glicose}] + [\text{ureia}]$$

O cálculo é aproximado e não substitui a medida direta. Duas situações alteram consideravelmente os valores obtidos por cálculo: a) aumento dos teores de proteínas ou lipídios plasmáticos, pois ambos diminuem a água plasmática por unidade de volume; b) também diferem quando elevados níveis de solutos de baixa massa molecular estão presentes no plasma (ex.: etanol).

Um aumento da osmolalidade no plasma desencadeia rapidamente a sede, provocando a ingestão de água para diluir o Na^+ e reajustar a osmolalidade para baixo.

A excreção de água pelo organismo é regulada por dois sistemas de controle. Um deles é proporcionado pelos osmorreceptores hipotalâmicos, que respondem a uma elevação da osmolalidade, fazendo com que a glândula hipofisária secrete o hormônio arginina-vasopressina (AVP), também conhecido como hormônio antidiurético (HAD), aumentando, por sua vez, a reabsorção da água nos túbulos coletores renais. Com a água conservada, a osmolalidade decresce e a secreção de AVP é inibida.

Com respeito à depleção de água, o parâmetro laboratorial mais importante é o sódio, especialmente para detectar a hiperosmolalidade causada pelas perdas de água.

Enfermidades preexistentes, tais como disfunção renal e diabetes podem aumentar as concentrações de ureia e glicose, contribuindo para a elevação da osmolalidade plasmática.

Deficiência de água

Indivíduos que apresentam deficiência de água (desidratação) também demonstram graus variáveis de depleção do sódio, pois todos os líquidos do organismo contêm este íon. A depleção de água está associada com hipovolemia (desidratação) e anormalidades nos níveis do sódio sérico e urinário, na osmolalidade e no volume que depende da via e do tipo de perda líquida. Em razão da quantidade concomitante da perda de sódio, a depleção de água é geralmente classificada com base nos tipos de perda de líquidos.

Depleção predominante de água

Na depleção de água "pura" tem-se: a) a ingestão inadequada de água (oral ou parenteral) em relação ao normal; b) perda renal (incluindo diabetes insípido e diurese osmótica). Podem ocorrer em: 1) indivíduos idosos, muito jovens ou muito doentes para ingerir líquidos; 2) terapia parenteral inapropriada; 3) distúrbios no centro da sede.

Perda de líquidos hipotônicos

A desidratação pela perda de líquidos contendo significantes quantidades de sódio (acompanhada de ingestão inadequada de líquidos) pode ser devida a: 1) perda pela pele: suor excessivo; 2) perda digestória: vômito, diarreia, gastroenterite, estomatite e drenagem em fístulas; 3) perda renal: terapia diurética, doença de Addison, nefrites perdedoras de sais, e diabetes insípido.

Perda de líquidos isotônicos

Refere-se à depleção líquida acompanhada do sódio. A perda envolve o compartimento extracelular. Não ocorrem alterações na osmolalidade do LEC (normonatremia) como também deslocamentos de água para o compartimento intracelular. Ocorre: 1) perda sanguínea: hemorragia e acidentes; 2) perda de plasma: queimaduras; 3) acúmulo no "terceiro espaço": pancreatite e peritonite.

Excesso de água

O excesso de água total se apresenta como edema periférico e hiponatremia. O edema sempre está acompanhado de excesso de sódio. A hiponatremia está associada com um conteúdo de água total normal ou levemente reduzido.

O excesso de água em geral reflete a diminuição da excreção renal pelo aumento da atividade do AVP. Pode ser devida a ingestão aumentada ou excreção inadequada de água, ou ambas. As principais causas: 1) retenção do sódio; 2) redução da excreção renal de água – *Síndrome de secreção inadequada do hormô-*

nio antidiurético (SSIHAD*)*. Tumores: carcinoma de brônquios, próstata e pâncreas. Tumores cerebrais: glioma e meningioma. Patologia cerebral: tumores, traumas/acidentes cerebrais, infecções, abscessos, meningite e encefalite. Patologia pulmonar: tumores, carcinoma bronquial. Infecções: tuberculose, pneumonia. Pneumotórax. Hidrotórax. Outras causas. Síndrome de Guillain-Barré e ingestão aguda de álcool. As características desse estado são a baixa osmolalidade sérica e hiponatremia associada com elevada osmolalidade urinária. 3) *Fármacos antidiuréticos.* Vários fármacos produzem uma síndrome indistinta da SSIHAD, pois estimulam a secreção de APV ou potencializando-o ao nível renal: a) fármacos que aumentam a secreção do HAD. Hipnóticos: barbitúricos. Narcóticos: morfina. Hipoglicêmicos: clorpropamida, tolbutamina. Anticonvulsivantes: carbamazepina. Antineoplásicos: vincristina, vimblastina, ciclofosfamida. Outros: clofibrato e derivados nicotínicos. b) Fármacos que potencializam a atividade do APV. Hipoglicêmicos: clorpropamida, tolbutamina, paracetamol e iodometacina. 4) *Hiponatremia diurético-relacionada*. São frequentes os achados de hiponatremia em pacientes sob terapia diurética e que estão relacionados à hipovolemia. Uma das características desse estado é a hipocalemia e a depleção de potássio (não associada a SSIHAD), principalmente em pacientes com mais de 70 anos de idade. O mecanismo exato ainda não foi esclarecido. a) Desordens endócrinas – hipotireoidismo e deficiência isolada de cortisol podem estar associados a síndromes semelhantes à SSIHAD. Aqui também a causa é desconhecida. b) Distúrbios na ingestão de água. A ingestão compulsiva de água não leva à intoxicação se a função renal estiver intacta.

■ SÓDIO (NA^+)

O sódio é o cátion predominante no líquido extracelular. Os níveis de sódio no organismo são regulados pelos rins e influenciados pelo hormônio aldosterona. O sódio é o principal responsável pela retenção de água e da osmolalidade nos líquidos vasculares. É também de grande importância na atividade neuromuscular e na ação da bomba sódio-potássio (Na^+,K^+ ATPase).

Regulação do teor de sódio plasmático

A concentração do sódio no plasma depende grandemente da ingestão e excreção da água e, em menor grau, pela regulação renal do Na^+. Três processos são fundamentais: 1) ingestão de água em resposta à sede, estimulada ou suprimida pela osmolalidade plasmática; 2) excreção de água, grandemente afetada pela liberação do NAP (peptídio natriurético atrial) em resposta às alterações no volume sanguíneo ou osmolalidade; 3) condições do volume sanguíneo que afeta a excreção do sódio pelo sistema renina-angiotensina II-aldosterona e o NAP (peptídio natriurético atrial). Os rins têm a capacidade de manter ou excretar grandes quantidades de sódio, dependendo do conteúdo de Na^+ no LEC e do volume sanguíneo. Normalmente 60% a 70% do Na^+ filtrado é reabsorvido no túbulo proximal; a eletroneutralidade é mantida tanto pela reabsorção do Cl^- como secreção do íon hidrogênio (H^+). Algum sódio é também reabsorvido na alça e no túbulo distal e (controlado pela aldosterona) trocado pelo K^+ no túbulo coletor cortical e segmento de conexão.

Hiponatremia

É a mais comum das desordens eletrolíticas. A hiponatremia é caracterizada por teores menores que 135 mmol/L, muitas vezes desenvolvida como consequência de elevados níveis do hormônio arginina-vasopressina (AVP). A elevação de AVP ocorre em várias condições clínicas, incluindo síndrome de secreção inapropriada de AVP, depleção de volume, estados pós-operatórios, insuficiência renal, cirrose, desordens neuroendócrinas e trauma. Níveis abaixo de 130 mmol/L são clinicamente significantes. Classificação usual das causas de hiponatremia: a) *Aumento da perda de sódio:* hipoadrenalismo, deficiência de potássio, uso de diuréticos, cetonúria, nefropatia perdedora de sais, vômito ou diarreia prolongada, queimaduras severas; b) *Aumento da retenção de água:* insuficiência renal, síndrome nefrótica, cirrose hepática, insuficiência cardíaca congestiva; c) *Distúrbios do equilíbrio aquoso:* excesso de ingestão de água, SSIHAD, pseudo-hiponatremia.

Hipernatremia

É o aumento de Na^+ no soro (> 150 mmol/L). a) *Excesso de perda de água:* diabetes insípido nefrogênico, desordem tubular renal, diarreia prolongada, sudoração excessiva, queimaduras severas. b) *Redução de ingestão de água*: idosos, crianças, dano mental. c) *Aumento da ingestão ou retenção:* hiperaldosteronismo, excesso de bicarbonato de sódio e excesso de líquido de diálise.

- **Determinação do sódio:** eletrodos íon-seletivos.
- **Amostra.** Soro ou plasma heparinizado.
- **Valores de referência para o sódio plasmático:** 135 a 145 mmol/L

Sódio na urina (natriúria)

A medida do teor de sódio urinário é vital na determinação da integridade da função de reabsorção tubular. Baixa concentração de sódio urinário indica não somente função tubular renal intacta, mas também a presença de estímulos para a conservação do sódio, enquanto valores elevados de sódio na urina podem indicar etiologias de perda de sal. O sódio na urina é determinado para distinguir as várias formas de insuficiência renal e classificar a hiponatremia.

Hipernatriúria

Condições associadas com o aumento de excreção de sódio na urina incluem: sal excessivo na dieta, terapia diurética, insuficiência adrenal, nefropatia perdedora de sal, necrose tubular aguda, abuso de analgésicos (induzido por nefrite intersticial), síndrome de secreção inapropriada do hormônio antidiurético (SSIHAD), vômito, hipotireoidismo, diurese pós-obstrutiva, insuficiência hepática, insuficiência cardíaco-congestiva, alguns antibióticos e prostaglandinas.

Hiponatriúria

Condições associadas com a redução de excreção de sódio na urina incluem: hiperaldosteronismo, hiponatremia, azotemia pré-renal, glomerulonefrite, síndrome hepatorrenal, insuficiência renal, síndrome nefrótica, alguns corticosteroides e anti-inflamatórios não esteroides.

- **Determinação do sódio na urina:** eletrodos íon-seletivos.
- **Amostra de urina para a determinação do sódio:** urina de 24 horas. Juntar 25 mL de ácido acético a 50% como preservativo no frasco antes de iniciar a coleta.
- **Valores de referência para o sódio urinário:** 40 a 220 mmol/d.

POTÁSSIO (K^+)

O potássio (K^+) é o principal cátion intracelular. Muitas funções necessitam que o organismo mantenha baixa a concentração de íons K^+ no plasma. Como resultado, somente 2% do K^+ total circula no plasma. Funções do K^+ no corpo incluem a regulação da excitabilidade neuromuscular, contração cardíaca, volume do LIC e concentração de H^+. O potássio é ingerido através de alimentos e bebidas, e excretado principalmente pela urina.

A determinação do potássio no sangue é utilizada no diagnóstico e tratamento de pacientes com hipertensão, insuficiência renal, arritmia cardíaca, desorientação, desidratação, náusea e diarreia.

Regulação do potássio plasmático

Os rins são fundamentais na regulação do equilíbrio do potássio. Inicialmente os túbulos proximais reabsorvem quase todo o K^+. Então, sob a influência da aldosterona, K^+ adicional é secretado na urina em troca pelo Na^+, tanto no túbulo distal quanto nos ductos coletores. Deste modo, o néfron distal é determinante na excreção urinária de potássio. Muitas pessoas consomem mais K^+ que o necessário; o excesso é excretado na urina, mas pode acumular de maneira tóxica se ocorrer insuficiência renal.

A captação do K^+ do LEC para o interior das células é um importante mecanismo na normalização em aumentos agudos de K^+ no plasma devido à ingestão excessiva. O K^+ celular gradualmente retorna ao plasma de onde é removido pela excreção urinária. Três fatores influenciam a distribuição do K^+ entre as células e LEC: 1) perda de K^+ quando a bomba Na^+, K^+-ATPase está inibida como na hipóxia, na hipomagnesemia ou no excesso de digoxina; 2) a insulina promove a entrada de K^+ no músculo esquelético e fígado pelo aumento da atividade da bomba Na^+, K^+-ATPase; e 3) catecolaminas, como a adrenalina (estimulador-β_2), promove a entrada celular do K^+, enquanto o propranolol (bloqueador β) bloqueia a entrada do K^+ na célula. Deficiência ou excesso de ingestão raramente é causa primária de hipocalemia ou hipercalemia.

Durante o *exercício* o K^+é liberado das células que podem aumentar o K^+ plasmático em 0,3 a 1,2 mmol/L e até 3 mmol/L em exercícios vigorosos. Essas alterações são geralmente revertidas após alguns minutos de descanso.

A *hiperosmolalidade,* como a encontrada no diabetes mélito não compensado, causa a difusão da água das células, carreando K^+, que leva a uma gradual depleção de K^+ se a função do rim estiver normal.

A *destruição celular* libera K^+ para o LEC. São exemplos: o trauma severo, a síndrome de lise tumoral e a transfusão de grandes quantidades de sangue.

Hiperpotassemia (hipercalemia)

Potássio acima de 5 mmol/L: a) *Redução da excreção renal:* insuficiência renal aguda ou crônica, hipoaldosteronismo, doença de Addison; b) *Deslocamento do potássio do espaço intracelular para o extracelular:* acidose, dano músculo/celular, quimioterapia, leucemia, hemólise (anemia hemolítica); c) *Excesso de ingestão:* terapia de reposição de potássio oral ou intravenosa, transfusão sanguínea, desordens na alimentação (anorexia, bulimia); (d) *Pseudo-hiperpotassemia:* hemólise da amostra, trombocitose, uso prolongado de torniquete na coleta da amostra.

Hipopotassemia (hipocalemia)

Potássio menor que 3,5 mmol/L: a) *Perda gastrointestinal:* vômito, diarreia, sucção prolongada, tumor intestinal, má absorção, quimioterapia, radioterapia, laxantes ou enemas; b) *Perdas renais:* diuréticos-tiazídicos e mineralocorticoides, nefrite, acidose tubular renal, hiperaldosteronismo, síndrome de Cushing, hipomagnesemia, leucemia aguda; c) *Deslocamento do potássio do espaço extracelular para o intracelular:* alcalose, excesso de insulina; d) *Déficit de ingestão de potássio.*

- **Determinação do potássio:** eletrodos íon-seletivos.
- **Amostra.** Soro, plasma heparinizado.
- **Valores de referência para o potássio plasmático:** 3,5 a 5,0 mmol/L.

CLORETOS

Os cloretos são os ânions mais abundantes do líquido extracelular. Juntamente com o sódio, os cloretos desempenham importante papel na manutenção da distribuição de água no organismo, pressão osmótica do plasma e neutralidade elétrica.

Regulação do teor de cloretos no plasma

O Cl^- mantém a eletroneutralidade por duas vias. Primeiro, o Na^+ é reabsorvido junto com o Cl^- nos túbulos proximais. Segundo, a eletroneutralidade é também mantida pelo *deslocamento de cloretos*. Nesse processo, o dióxido de carbono gerado pelo metabolismo forma ácido carbônico, que libera H^+ e bicarbonato. A deoxi-hemoglobina tampona o H^+ enquanto o bicarbonato difunde para o plasma. O Cl^- penetra na célula em troca de bicarbonato para manter a eletroneutralidade.

Hipocloremia

É a redução dos níveis de cloretos plasmáticos. Causas: perda gastrointestinal de bicarbonato, nefropatia perdedora de sal, insuficiência adrenal, acidose metabólica com acúmulo de ânions orgânicos (cetoacidose diabética), alcalose metabólica, hipoaldosteronismo primário.

Hipercloremia

É o aumento de cloretos no plasma e está geralmente associada com a hipernatremia. Principal causa: acidose metabólica (redução do bicarbonato).

- **Determinação dos cloretos:** eletrodos íon-seletivos.
- **Amostra:** soro ou plasma heparinizado.
- **Valores de referência para os cloretos:** 98 a 106 mmol/L.

Fibrose cística

Fibrose cística, também chamada de mucoviscidose, é uma doença autossômica recessiva (incidência no Brasil de 1:7.000 nascidos vivos), caracterizada pela falta ou defeito em uma glicoproteína de membrana, denominada *regulador da condutividade transmembrânica da fibrose cística* (CFTR), que atua como um canal para íons cloreto nas células epiteliais e é um membro da família de proteínas *transportadoras com cassete de ligação* à ATP (ABC). O canal para íons cloreto é vital para a absorção de sal (NaCl) e água através das membranas plasmáticas de células epiteliais em tecidos como pulmões, fígado, intestino delgado e glândulas sudoríparas. Na fibrose cística, o defeito dos canais CFTR resulta na retenção de Cl^- no interior das células. Um muco espesso ou outras formas de secreção causam excessiva captação de água devido à pressão osmótica. As características encontradas na fibrose cística são a doença pulmonar (obstrução do fluxo de ar e infecções bacterianas crônicas), e a insuficiência pancreática (impedimento da produção de enzimas digestivas que pode resultar em deficiência nutricional severa).

Diagnóstico laboratorial da fibrose cística

O diagnóstico de fibrose cística é clínico, podendo ser ratificado pela detecção de níveis elevados de cloreto e sódio no suor ou por estudo genético com a identificaçção de mutações para a fibrose cística. O teste efetuado no suor é a análise iônica quantitativa estimulada pela pilocarpina.

- **Valores de referência para cloreto e sódio no suor:** consideram-se positivos os valores de cloreto e sódio no suor > 60 mEq/L em pelo menos duas aferições.

BICARBONATO

O bicarbonato é o segundo ânion mais importante do LEC. O CO_2 total compreende o íon bicarbonato (HCO_3^-), o ácido carbônico (H_2CO_3) e o CO_2 dissolvido. Em pH fisiológico, o bicarbonato compõe a maior fração do CO_2 total (90%); a medida do mesmo é um indicativo da medida do bicarbonato. O HCO_3^- é o principal componente do sistema tampão no sangue. A *anidrase carbônica* (AC) nos eritrócitos converte CO_2 e H_2O a ácido carbônico, que se dissocia em H^+ e HCO_3^-.

$$H_2O + CO_2 \overset{AC}{\leftrightarrow} H_2CO_3 \overset{AC}{\leftrightarrow} H^+ + HCO_3^-$$

O HCO_3^- difunde para o exterior da célula, em troca pelo Cl^-, para manter a neutralidade da carga iônica no interior das células (deslocamento de cloreto). O processo converte o potencialmente tóxico CO_2 no plasma em tampão bicarbonato. O HCO_3^- tampona o excesso de H^+ pela formação de ácido, que se dissocia em H_2O e CO_2 nos pulmões, onde o CO_2 é eliminado.

Regulação do bicarbonato

A maior parte de HCO_3^- é reabsorvida nos rins (85%) pelos túbulos proximais, com 15% sendo reabsorvido pelos túbulos distais. Como os túbulos são parcialmente impermeáveis ao HCO_3^-, ele é geralmente reabsorvido como CO_2. Isso ocorre como HCO_3^-, que após filtração nos túbulos, combina com o H^+ para formar ácido carbônico, que então dissocia em H_2O e CO_2. O CO_2 rapidamente difunde para o interior do LEC. Normalmente, quase todo o HCO_3^- é reabsorvido pelos túbulos, com pequena perda na urina. Quando HCO_3^- é filtrado, em presença de excesso de H^+, quase todo o excesso de HCO_3^- flui para a urina.

Na alcalose, com o aumento relativo no HCO_3^- em relação ao CO_2, os rins aumentam a excreção do HCO_3^- na urina, carreando junto o Na^+. Essa perda de bicarbonato do organismo colabora para a correção do pH.

Dentre as respostas do organismo à acidose, está o aumento da excreção de H^+ na urina. Além disso, a reabsorção do HCO_3^- é virtualmente completa, com 90% do bicarbonato filtrado reabsorvido no túbulo proximal, e o restante no túbulo distal.

- **Determinação do dióxido de carbono.** Aqui a determinação é tratada especificamente no soro ou no plasma venoso. A determinação no sangue arterial como $PaCO_2$ é realizada por gasometria arterial. O CO_2 total é determinado por eletrodos íon-seletivos e métodos enzimáticos.
- **Amostra:** soro ou plasma heparinizado (lítio heparina). Manter o frasco fechado para evitar a perda de CO_2. Realizar a determinação imediatamente após a separação do soro ou plasma.
- **Valores de referência para o dióxido de carbono:** 23 a 29 mmol/L (plasma e soro).

CÁLCIO

O cálcio está presente em três compartimentos principais: esqueleto (99% do total), tecidos moles (1% do total), e líquido extracelular (menos que 0,2% do total). O cálcio apresenta diferentes funções fisiológicas em diferentes compartimentos: 1) *Cálcio intracelular:* o cálcio ionizado facilita a condução neuromuscular, a contração e o relaxamento do

músculo esquelético e cardíaco. Atua na regulação da função das glândulas exócrinas e endócrinas; 2) *Cálcio extracelular:* exerce papel importante na mineralização óssea, no mecanismo da coagulação sanguínea e na manutenção do potencial de membrana plasmática que influencia a permeabilidade e a excitabilidade; 3) *Cálcio do esqueleto:* é o principal local de armazenamento e mobilização de cálcio para o "pool" extracelular e intracelular. O osso é continuamente remodelado por um processo combinado de reabsorção e formação óssea.

O cálcio no plasma humano normal apresenta-se sob três formas distintas: 1) *cálcio ligado a proteínas plasmáticas;* 2) *cálcio livre* (*ionizado*) é a forma biologicamente ativa (45% a 50% do total; 3) *cálcio complexado:* constituído por uma variedade de ânions, tais como: citrato, fosfato, lactato, bicarbonato, e outros íons. Compreende (5% a 10% do total).

Controle do metabolismo do cálcio

A manutenção da homeostase do cálcio envolve três órgãos: *intestino delgado*, *rins* e *esqueleto*. A glândula mamária, durante a lactação, é também importante, assim como a placenta e o feto durante a gestação. Vários compostos estão envolvidos na regulação do cálcio plasmático. Os dois principais são: o *paratormônio* (PTH) e a *vitamina D.* Outras substâncias contribuem em menor grau: calcitonina, hormônios da tireoide, esteroides adrenais, prostaglandinas, fator ativador dos osteoclastos e proteína PTH-relacionada.

Hipocalcemia

A deficiência de cálcio deve ser examinada sob a luz das variáveis que afetam fisiologicamente o cálcio ionizado ativo, principalmente em relação ao teor de proteínas plasmáticas e pH sanguíneo. A hipocalcemia verdadeira (redução de cálcio total e ionizado) inclui: hipoparatireoidismo (aplasia glandular, destruição ou remoção); hipoalbuminemia (afeta o cálcio total); concentração do H^+ no plasma; pseudo-hipoparatireoidismo; insuficiência renal; deficiência de vitamina D (deficiência nutricional, redução da exposição ao sol); raquitismo dependente de vitamina D; má absorção de vitamina D; doença hepatocelular crônica; doença pancreática; síndrome nefrótica; desordem tubular renal; anticonvulsivantes; hiperfosfatemia; síndrome de osso faminto; doenças graves; hipocalcemia neonatal; pancreatite aguda; hipomagnesemia.

- **Determinação do cálcio:** o-cresolftaleína complexona (CPC) ou o corante arseno III.
- **Amostra:** *soro* ou *plasma heparinizado* (lítio) isentos de hemólise e separados prontamente após a coleta, para evitar a captação do cálcio pelos eritrócitos. O sangue deve ser colhido sem estase venosa para evitar as variações do cálcio, ligado às proteínas. Antes da prova, o paciente deve consumir dieta com quantidades normais de cálcio, 600 a 800 mg/d durante três dias.
- **Valores de referência para o cálcio plasmático:** 8,9 a 10,1 mg/dL.

Cálcio urinário

A concentração do cálcio total na urina reflete: absorção intestinal, reabsorção óssea, filtração e reabsorção tubular renal. A medida do cálcio urinário é indicada no acompanhamento das terapias de reposição e na avaliação do metabolismo do cálcio nas doenças ósseas, na nefrolitíase, na hipercalciúria idiopática e nas doenças da paratireoide.

Hipocalciúria

Deficiência de vitamina D, hipocalciúria familiar, hipoparatireoidismo, esteatorreia, pseudo-hipoparatireoidismo, metástases de câncer de próstata, osteodistrofia renal, osteomalácia, pré-eclâmpsia, diuréticos tiazídicos.

Hipercalciúria

O excesso de excreção de cálcio na urina é a causa mais comum de formação de cálculo renal. Outras causas significantes são: hiperoxalúria, hiperuricosúria, volume urinário baixo e hipocitratúria. Define-se hipercalciúria conforme Tabela 4.4.

Tabela 4.4 Definição de hipercalciúria.

Dieta	Definição
Dieta normal (sem restrições)	Mulheres: > 250 mg/d de cálcio Homens: > 275-300 mg/d de cálcio
	> 4 mg/d de cálcio por quilo de peso corporal
Dieta restrita (400 mg de cálcio, 100 mEq sódio)	> 200 mg/d de cálcio
	> 3 mg/d de cálcio por quilo de peso corporal

Fonte: Acervo do autor.

Os tipos mais comuns de hipercalciúria clinicamente significantes são: absortivas (I, II e III), renais, reabsortivas, e perdas renais de fosfato.

Outras causas de hipercalciúria incluem: hipertireoidismo, acidose tubular renal, sarcoidose e outras doenças granulomatosas, intoxicação por vitamina D, excesso de glicocorticoides, doença de Paget, acidose tubular de Albright, várias síndromes paraneoplásicas, imobilização prolongada, estados hipofosfatêmicos induzidos, mieloma múltiplo, linfoma, leucemia, tumores metastáticos especialmente ósseos, doença de Addison e síndrome leite-álcali.

Cerca de 80% de todos os cálculos renais contêm cálcio e, no mínimo, um terço de todos os cálculos de cálcio são encontrados em pacientes com hipercalciúria. A hipercalciúria contribui para a formação de cálculos renais e osteoporose.

- **Determinação do cálcio urinário:** o-cresolftaleína complexona (CPC) ou o corante arseno III.

- **Amostra para o cálcio urinário.** O cálcio na urina é mantido sem precipitação durante a coleta ou quando armazenado, pela adição de 10 mL de ácido clorídrico 6 mol/L ao frasco de coleta para atingir o pH de 3 a 4.
- **Valores de referência para o cálcio urinário:** Dieta normal: 150 a 300 mg/d.

FÓSFORO (FOSFATO)

Encontrados em todas as células vivas, os compostos de fosfato participam de muitos dos mais importantes processos bioquímicos. Os materiais genéticos ácido ribonucleico (RNA) e ácido desoxirribonucleico (DNA) são complexos de fosfodiésteres. A maioria das coenzimas é estere do ácido fosfórico e pirofosfórico. Os mais importantes reservatórios de energia bioquímica são o ATP, a creatina fosfato e o fosfoenolpiruvato. A deficiência de fosfato pode produzir depleção de ATP, que em última instância é responsável pelos sintomas clínicos encontrados na hipofosfatemia. Alterações na concentração do 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG) nos eritrócitos afeta a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Por atuar na formação de 2,3-BPG, a concentração de fosfato inorgânico afeta indiretamente a liberação de oxigênio pela hemoglobina.

Compreender o que origina níveis alterados de fosfato no sangue muitas vezes é difícil, já que o seu deslocamento transcelular é a principal causa da hipofosfatemia. Ou seja, um aumento no deslocamento do fosfato para o interior das células pode reduzir o fosfato sanguíneo. Ao ser capturado pela célula, o fosfato pode ser usado na síntese de compostos fosforilados. Como esses compostos de fosfato são metabolizados, o fosfato inorgânico lentamente deixa a célula para o sangue, onde é regulado principalmente pelos rins.

Regulação do fosfato

O fosfato presente no sangue pode ser proveniente da dieta, por absorção intestinal, liberado das células ou perdido pelos ossos. Em indivíduos normais, todos esses processos são relativamente constantes e facilmente regulados pela excreção ou reabsorção renal de fosfato.

Distúrbios em qualquer desses processos podem alterar a concentração de fosfato no sangue; entretanto, a falta de regulação pelos rins produzirá os mais profundos efeitos. Apesar de outros fatores, como a vitamina D, calcitonina, hormônio do crescimento e o estado ácido-base poderem afetar a regulação renal do fosfato. O fator mais importante é o paratormônio (PTH) que, de modo geral, reduz a concentração sanguínea de fosfato pelo aumento da excreção renal. A vitamina D atua no aumento do fosfato no sangue; eleva tanto a absorção do fosfato no intestino como a reabsorção renal. O hormônio do crescimento atua na regulação do crescimento do esqueleto, e pode afetar as concentrações de fosfato no sangue. Em casos de administração ou secreção excessiva de hormônio do crescimento, os níveis de fosfato no sangue podem aumentar pela redução da excreção renal do mesmo.

Distribuição

O fosfato é um ânion predominantemente intracelular, com concentrações variáveis, dependendo do tipo de célula. Cerca de 80% a 90% do total está presente nos ossos, 10% a 20% em tecidos moles, e menos de 1% na forma ativa no plasma.

Hipofosfatemia

Existem quatro causas gerais: desvio do fosfato do espaço extracelular para o intracelular, perda renal de fosfato, perda pelo trato gastrointestinal e perda de estoques intracelulares. A hipofosfatemia é encontrada, às vezes, em pacientes com cetoacidose diabética, doença obstrutiva pulmonar crônica, asma, malignidade, nutrição parenteral por longo tempo, doença intestinal inflamatória, anorexia nervosa e alcoolismo. Em internados em CTI com sepse, a hipofosfatemia é encontrada em até 80% dos pacientes. A hipofosfatemia pode também ser causada pelo aumento da excreção renal (hiperparatireoidismo) e redução da absorção intestinal (deficiência da viamina D ou uso de antiácidos).

Hiperfosfatemia

Geralmente é secundária à incapacidade dos rins em excretar fosfato (insuficiência renal aguda ou crônica). Outros fatores: ingestão aumentada ou um desvio do fosfato dos tecidos para o líquido extracelular. Como ainda não desenvolveram plenamente a produção de PTH e o metabolismo de vitamina D, os neonatos são especialmente suscetíveis à hiperfosfatemia causada pela ingestão aumentada de leite de vaca ou laxantes. Aumentos da destruição celular podem, às vezes, levar à hiperfosfatemia, como em infecções severas, exercícios intensos, desordens neoplásicas ou hemólise intravascular. Como os linfoblastos imaturos contêm quatro vezes mais fosfato que os linfócitos maduros, pacientes com leucemia linfoblástica são especialmente suscetíveis à hiperfosfatemia.

- **Determinação do fósforo:** formação de complexo fósforo molibdato, com leitura em 340 nm ou convertido em azul de molibdênio com leitura em 600 a 700 nm.
- **Amostra:** soro, plasma heparinizado, e urina de 24 horas.
- **Valores de referência para o fósforo:**

Adultos	2,2 a 4,5 mg/dL
Recém-nascidos	3,5 a 8,6 mg/dL
Crianças	4,0 a 7,0 mg/dL
Urina (adultos)	400 a 1.300 mg/d

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Assadi F. Hiponatremia: a problem-solving approach to clinical cases. J. Nephrol 2012; 25(4):473-80.
2. Choi MJ, Ziyadeh FN. The utility of the transtubular potassium gradient in the evaluation of hyperkalemia. J Am Soc Nephrol 2008; 19:424-26.
3. LeFever Kee J, Paulanka BJ, Polek C. Handbook of Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Imbalances. 3 ed. Delmar, 2010.
4. Motta VT. Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações. 5 ed. Medbook, 2009: 139-180.
5. Polancic JE. Electrolytes. In: Bishop ML, Edward P, Fody EP, Schoeff LE. Clinical chemistry: techniques, principles, correlations. 6 ed. Lippincott, 2010: 356-383.

5

capítulo

Geraldo Picheth

Diabetes *Mellitus*

DEFINIÇÃO

A Associação Americana de Diabetes (ADA), legitimada por múltiplas entidades internacionais e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) definem o diabetes *mellitus* como "um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina, ação da insulina ou ambos. A hiperglicemia crônica do diabetes está associada a lesões de evolução lenta, disfunções e insuficiências de diferentes órgãos, especialmente os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos".

Portanto, o diabetes *mellitus* (ou Diabetes melito, DM) contempla um grupo heterogêneo de processos patológicos que apresentam em comum a hiperglicemia crônica.

O DIABETES EM NÚMEROS

Múltiplos estudos, incluindo metanálises, comprovam que o DM é uma patologia em expansão. O termo "epidemia de diabetes" empregado para pontuar a rápida expansão da doença é pertinente. As projeções para o ano de 2030 sugerem a presença de mais de 550 milhões de diabéticos no mundo, e número semelhante de indivíduos com risco aumentado de diabetes (pré-diabetes), com crescimento global da patologia superior a 50% (Figura 5.1). Esse processo de rápida evolução do número de diabéticos está diretamente associado ao aumento de peso e à obesidade observados em todos os países. O Brasil, em 2012, contava com 13,4 milhões de diabéticos em sua população com idades entre 20 e 79 anos, ou seja, cerca de 7% da população adulta.

As concentrações de glicose no sangue são controladas por diversos mecanismos, principalmente os fluxos hormonais (Figura 5.1).

O pâncreas tem função central na homeostasia da glicose através de hormônios polipetídios produzidos nas ilhotas de Langerhans (Figura 5.2). As células α-pancreáticas produzem o hormônio glucagon, de ação hiperglicemiante,

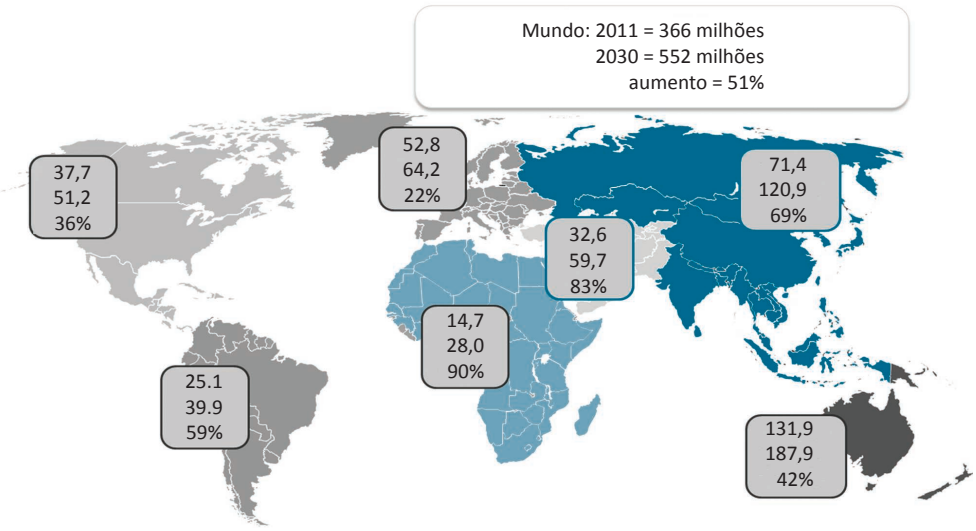


Figura 5.1 Estimativa da evolução do diabetes no mundo. Os quadros mostram, na parte superior, a frequência de indivíduos diabéticos estimada para o ano de 2011. Acima, a projeção para 2030, e a porcentagem esperada de aumento por continente.
Fonte: Kozak BM; *et al*., 2012. Whiting DR; *et al*., 2011.

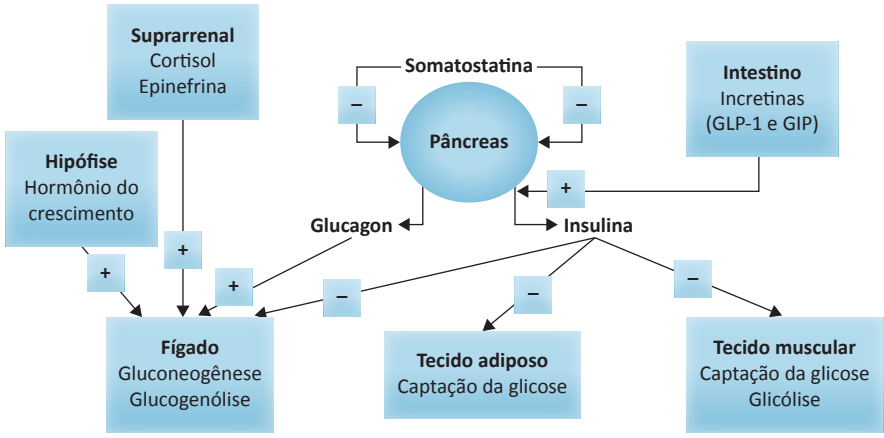


Figura 5.2 Regulação hormonal da glicose sanguínea. Os símbolos ⊕ e Θ indicam estímulo e inibição para o aumento da glicemia.
Fonte: Adaptada de Bishop *et al.*, 2013.

enquanto as células β, o hormônio insulina, o único que promove a redução da glicose sanguínea. A somatostatina produzida nas células δ-pancreáticas tem efeito inibidor regulatório na liberação do glucagon e da insulina. Os hormônios cortisol, epinefrina e hormônio do crescimento têm efeito de aumentar a glicemia, principalmente estimulando a liberação de glicose pelo fígado. As ações do ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e a tiroxina promovem o aumento da glicemia. As incretinas, hormônios polipetídios secretados pelas células enteroendócrinas, principalmente o GIP (polipetídio insulinotrópico glicose-dependente) e o GLP-1 (peptídeo-1 semelhante ao glucagon) estimulam a liberação de insulina pancreática e inibem a ação do glucagon.

A manutenção da concentração sanguínea de glicose estável (homeostasia da glicose), mesmo em períodos de ausência de aporte alimentar, é fisiologicamente importante para suprir tecidos que utilizam esse carboidrato como fonte energética principal, a exemplo do tecido nervoso.

O diabetes *mellitus* é classificado em quatro classes, reconhecidas pelas principais entidades mundiais no tema, como mostrado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 Classificação etiológica do diabetes *mellitus*.

	Tipos de diabetes	Frequências
I.	Diabetes tipo 1 A. Imunomediado B. Idiopático	5%-10%
II.	Diabetes tipo 2	> 90%
III.	Diabetes *mellitus* gestacional A. Defeitos genéticos relacionados à função da célula β-pancreática B. Defeitos genéticos na ação da insulina C. Doenças do pâncreas exócrino D. Endocrinopatias E. Induzido por drogas ou substâncias químicas F. Infecções G. Formas incomuns de diabetes imunomediado H. Outras síndromes genéticas, algumas vezes associadas ao diabetes	< 5% (?)
IV.	Outros tipos de diabetes	1%-14% das gestações

Fonte: Adaptada de American-Diabetes-Association. Standards of Medical Care in Diabetes 2017. Diabetes Care, 2017, 40, Suppl 1:S11-S24.

SINAIS E SINTOMAS ASSOCIADOS AO DIABETES

O termo diabetes, de origem grega, tem o significado de "sifonar", e "*mellitus* ou melito", semelhante ao mel (sabor doce). A terminologia reflete os principais sintomas da patologia, a poliúria, a polidipsia, e a presença de glicose na urina. O afetado tem sede intensa e urina grandes volumes de "sabor" doce, como se a urina passasse por ele como em um sistema de sifonagem.

De longa data se reconhecem os principais sinais e sintomas associados ao diabetes (Figura 5.3). Um grupo de sintomas, designados clássicos, estão presentes principalmente no diabetes tipo 1, mnemonicamente designados 4Ps (Poliúria, Polidipsia, Polifagia e Perda de peso), e refletem insuficiência aguda de insulina. Os outros sintomas são gerais, também frequentes em diferentes processos patológicos, e no diabético estão associados às complicações da hiperglicemia crônica. É relevante ressaltar que muitos indivíduos com diabetes tipo 2 são assintomáticos, o que demonstra a necessidade da realização de exames periódicos para o diagnóstico.

FISIOPATOLOGIA DO DIABETES

A patofisiologia do diabetes, apesar dos avanços no conhecimento da patologia, não é completamente conhecida. A Figura 5.4 sumariza os principais elementos associados aos tipos de diabetes mais frequentes.

Diabetes tipo 1

O diabetes tipo 1 tem predisposição genética associada a genes do sistema HLA (antígeno leucocitário humano) e está relacionado a uma agressão autoimune às células β–-pancreáticas, resultando na destruição do sítio produtor de insulina e, consequentemente, a uma deficiência desse hormônio, que necessita reposição externa (insulinoterapia) para

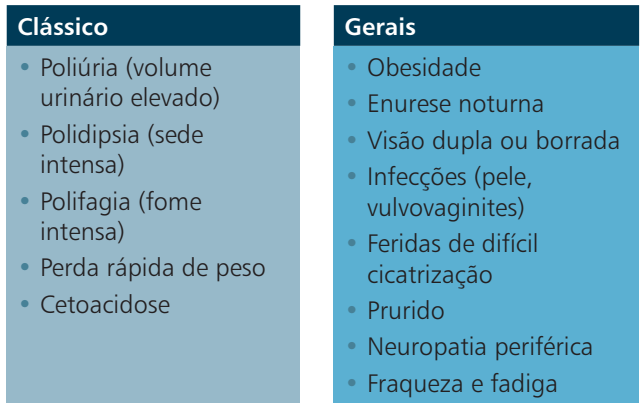


Figura 5.3 Principais sinais e sintomas associados ao diabetes.
Fonte: Adaptada de SBD, 2015-2016.

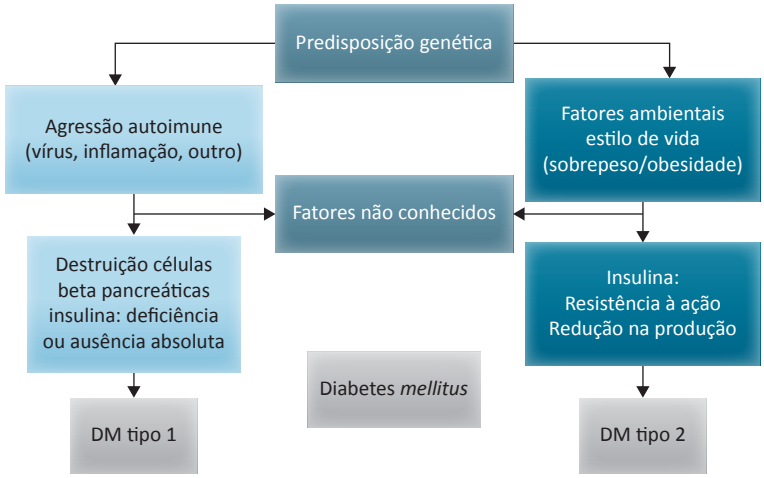


Figura 5.4 Principais elementos relacionados à patofisiologia do diabetes.
Fonte: Sacks DB; *et al.*, 2011.

que o paciente sobreviva. Presença de autoanticorpos contra várias estruturas celulares (antiGAD65, anti-insulina, antitirosinafosfatase, dentre outras) está presente na grande maioria dos pacientes com DM1, grupo designado diabetes tipo 1A. Em outro grupo minoritário, que apresenta deficiência de produção de insulina, diabetes tipo 1B, não há alteração dos marcadores de autoimunidade contra a célula β-pancreática ou com o sistema HLA, sendo considerado idiopático.

Pacientes com DM1 estão sujeitos a apresentar cetoacidose, um evento de elevada gravidade, raro em outros tipos de diabetes.

Diabete tipo 2

O DM2 é um tipo de diabetes reconhecidamente poligênico (vários locos gênicos envolvidos) e caracterizado por padrões de transmissão genéticos bem definidos. No DM2, fatores ambientais como o estilo de vida, inatividade física e muito fortemente (> 90%) a presença de sobrepeso ou obesidade (IMC > 25 kg/m^2) são fatores predisponentes à resistência e ação da insulina, e na evolução do processo a redução da produção desse hormônio.

Outros tipos específicos de diabetes

Esse grupo congrega vários processos patológicos que produzem alteração na glicemia. O destaque nesse grupo heterogêneo está nas alterações genéticas monogênicas associadas à célula β-pancreática, como os diferentes tipos de diabetes MODY (diabetes da maturidade em jovens; *Maturity Onset Diabetes of the Young*). Mutações que afetem genes como o da enzima glucoquinase (MODY-2 ou GCK-MODY), um sensor da glicemia, ou de fatores de transcrição como o fator hepatocítico nuclear (HNF1-α ou MODY-3), agentes que regulam a expressão de genes são exemplos desse tipo de diabetes.

Diabetes gestacional

A definição de *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) vem sofrendo modificações nos últimos anos. O diabetes identificado inicialmente durante a gestação é discutido de forma mais abrangente, com os novos critérios diagnósticos.

É relevante pontuar que há fatores não conhecidos associados ao diabetes, incluindo aqueles que necessitam de comprovação com maior número de estudos. As características de heterogeneidade do diabetes sugerem que à medida que as pesquisas avançarem novos tipos específicos de diabetes poderão ser estabelecidos, com patofisiologia específica.

A Tabela 5.2 resume as principais características dos tipos de diabetes mais frequentes. O diabetes latente autoimune do adulto (LADA, *latent autoimmune diabetes in adults*) ou tipo 1,5 (um e meio), descrito no final dos anos 1980, caracteriza um subgrupo de pacientes com diabetes que, embora apresentem autoanticorpos (como o GAD65) contra a célula β-pancreática, mantém a produção de insulina preservada por um período de tempo. Esses indivíduos têm sido referidos como diabéticos tipo 1 latentes e se diferenciam do diabetes tipo 2 clássico. A designação de diabetes 1,5 é sugestiva das características comuns ou de transição entre ambos os tipos 1 e 2 do diabetes.

Tabela 5.2 Características dos principais tipos de diabetes.

	Tipos de diabetes		
Características	**DM1**	**DM 1,5**	**DM 2**
Nomenclatura antiga	Diabetes insulino-dependente	LADA Tipo ½	Diabetes não insulinodependente
Idade de início, anos	< 20 (3-40)	~35 (20-70)	> 40 (35-80)
% dos diabéticos	~10%	~10%	~ 80%
Sintomas clássicos	Sim	Não	Não
Peso corporal	Magro	Intermediário	Obeso (> 90%)
Dependência de insulina exógena	Sim Urgente: no diagnóstico	Sim Usual após ~6 anos do diagnóstico Hipoglicemiantes orais	Não Hipoglicemiantes orais Pode necessitar após vários anos
Presença de autoanticorpos	Sim (ICA, IA2, GAD65, IAA)	Sim (GAD65)	Não
Resistência à insulina	Não	Parcial	Sim

LADA: diabetes latente autoimune do adulto.

Fonte: Adaptada de Laugesen E, *et al*., 2015.

DIAGNÓSTICO DO DIABETES *MELLITUS*

O diagnóstico do diabetes está baseado na concentração de glicose no sangue. Os critérios atuais para o diabetes se fundamentam nas concentrações glicêmicas associadas à prevalência de retinopatia, uma complicação frequente da patologia, e estão descritas na Tabela 5.3.

Não está disponível um ensaio *gold standard* (ou padrão-ouro) para o diagnóstico do diabetes. Todos os critérios diagnósticos apresentam vantagens e desvantagens intrínsecas aos processos.

O risco para desenvolvimento do diabetes associado às concentrações da glicemia é contínuo. Portanto, os valores de corte propostos para risco aumentado do diabetes refletem pontos que fazem um balanço de falso-negativos (falha em identificar aqueles que se tornarão diabéticos), e falso-positivos (identificação incorreta de pacientes que desenvolverão diabetes com as implicações nos gastos com intervenções desnecessárias). Em pacientes com diabetes tipo 2, quando do diagnóstico laboratorial, estima-se que o diabetes já esteja em curso por cerca de quatro a sete anos antes do diagnóstico

As categorias de risco aumentado para o diabetes, também designado de pré-diabetes, estão representadas na Tabela 5.4. Esse grupo de pacientes, além do diabetes, tem maior risco para doença cardiovascular

Diagnóstico do diabetes gestacional

A gestação normal evolui para uma resistência progressiva à insulina, que tem início próximo à metade da gestação e progride até o terceiro trimestre, a níveis que se aproximam dos observados em pacientes com diabetes tipo 2. Essa resistência à insulina resulta da combinação do aumento da adiposidade materna e dos efeitos dos hormônios produzidos pela placenta, com destaque para o hormônio lactogênio placentário e estrógenos.

O Diabetes Gestacional (DMG) é definido como intolerância à glicose, de início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez.

Tabela 5.3 Critérios para o diagnóstico do diabetes.

Critérios	Analitos	Concentrações	Comentários
1*	HbA1C	≥ 6,5 %	O teste deve ser realizado com método padronizado e certificado pelo NSGP e padronizado pelo ensaio do DCCT
ou			
2*	Glicemia de jejum	≥ 126 mg/dL	Jejum definido como ausência de ingesta de alimentos calóricos por, no mínimo, 8h
ou			
3*	Glicemia 2h após 75 g de glicose oral	≥ 200 mg/dL	O teste deve ser realizado como descrito pela OMS, utilizando dose oral de glicose contendo o equivalente a 75 g de glicose dissolvida em água
ou			
4	Glicemia ao acaso	200 mg/dL	Esse critério diagnóstico deve ser associado a sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica

*Na ausência de glicemia inequívoca, os critérios 1 a 3 devem ser confirmados por repetição do teste.

Glicemia em mg/dL × 0,0555 = mmol/L.

Fonte: ADA, 2017; SBD, 2015-2016.

Tabela 5.4 Categorias que apresentam risco aumentado para o diabetes (pré-diabetes).

Analitos	Concentrações	Nomenclatura*
Glicemia de jejum	100 a 125 mg/dL	Glicemia de jejum alterada
Glicemia 2h após 75 g de glicose oral	140 a 199 mg/dL	Tolerância à glicose diminuída
HbA1C	5,7% a 6,4%	–

*Sociedade Brasileira de Diabetes, 2015-2016, e ADA 2017.

Fonte: ADA, 2017; SBD, 2015-2016.

Essa definição clássica, no entanto, permite que mulheres com diabetes tipos 1, tipo 2 ou outros, que não tenham sido diagnosticadas previamente à gestação, sejam classificadas como diabéticas gestacionais. Essas alterações hormonais fisiológicas também afetam as concentrações dos lípides na gestação. O DMG induz a um estado de dislipidemia consistente com a resistência à insulina e à concentração de estrogênio. Durante a gestação, mulheres com diabetes gestacional apresentam concentrações elevadas de triglicerídios e reduzidas de LDL-C quando comparadas àquelas com gestações normais (Koukkou). Marcadores para o DMG com base nas concentrações de lípides séricos têm sido sugeridos.

O estudo HAPO (*Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes study*) foi um marco relevante na consolidação dos efeitos adversos da hiperglicemia crônica na gestação. Esse estudo epidemiológico multicêntrico de larga escala (cerca de 25 mil gestantes avaliadas) demonstrou que o risco de efeitos adversos maternos, fetais e para o neonato aumentam continuamente relacionados à glicemia materna medida entre a 24ª e a 28ª semana de gestação.

O DMG guarda similaridade com o diabetes tipo 2, e no Brasil a frequência média da patologia afeta certa de 7% das gestações. Após o parto, a maioria das pacientes com DMG retorna à normoglicemia, mas o risco dessas pacientes em desenvolver DM2 no futuro é aumentado (10% a 63%).

Portanto, as diretrizes atuais recomendam que, no início da gestação, a gestante seja avaliada para o diagnóstico do diabetes, com os procedimentos padronizados para a população geral (Tabela 5.3). Aquelas que apresentarem os biomarcadores de hiperglicemia compatíveis com diagnóstico de DM serão classificadas como diabetes manifesto (*overt diabetes*), uma nova categoria que busca identificar o diabetes pré-gestacional, a qual deve ser caracterizada com outros ensaios para definir o tipo de diabetes (tipo 1, tipo 2 ou outros tipos específicos). Somente aquelas que apresentarem glicemia de jejum entre 92 e 125 mg/dL serão caracterizadas como apresentando DMG no início da gestação. Gestantes com glicemia < 92 mg/dL deverão ser encaminhadas para a realização de curva glicêmica entre a 24ª e a 28ª semana de gestação. Se a glicemia de jejum for igual ou superior a 126 mg/dL, o diagnóstico de diabetes manifesto será consignado. As gestantes que apresentarem alterações na glicemia após a administração oral de 75 g de glicose (curva glicêmica), acima dos valores de corte recomendados, serão caracterizadas como DMG. É importante ressaltar que apenas um valor, em qualquer tempo na curva glicêmica, é suficiente para o diagnóstico de DMG.

A Figura 5.5 esquematiza os critérios para o diagnóstico do diabetes gestacional segundo a IADPSG.

Os fatores de risco para o diabetes gestacional e tipo 2 têm íntima relação, como estão apresentados na Figura 5.6. Nesses dois fatores são proeminentes em todos os estudos: a obesidade e a história familiar com presença do diabetes.

As metas estabelecidas para o controle glicêmico estão apresentadas na Tabela 5.5. As diferentes propostas das sociedades envolvidas no diabetes mostram que não há consenso neste tópico. Em especial para crianças, as metas apresentam maior tolerância, lembrando que as metas muito restritivas aumentam o risco de crises severas e indesejáveis de hipoglicemia.

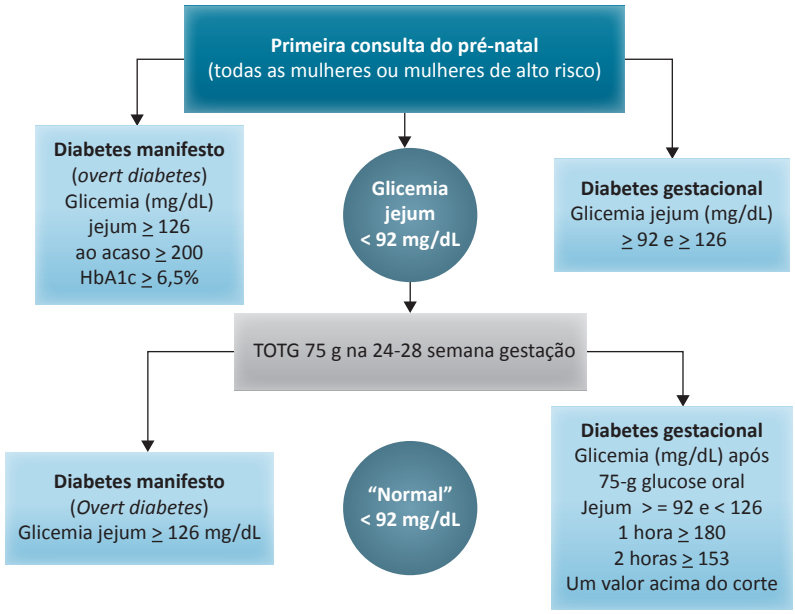


Figura 5.5 Critérios para o diagnóstico do diabetes gestacional segundo a IADPSG. Critérios da *International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups* (IADPSG) aceitos pela Associação Americana de Diabetes (ADA) e outras instituições.
Fonte: ADA, 2017.

Obesidade pais ou irmãos com dm2	Obesidade e sobrepeso história familiar de dm
• **DMG prévio ou parto de criança com > 4.000 g**	• **História de parto com criança com > 4.000 g**
• **Hipertensão ou síndrome metabólica**	• **História de matabolismo anormal da glicose**
• Mães com peso ao nascer > 4.000 g	• História do próprio peso ao nascer > 4.000 g
• Síndrome do ovário policístico	• Raça/etnia de alto risco
• Raça/etnia de alto risco	• Idade ≥ 35 anos
• Acantose *nigricans*	• Baixa estatura (< 1,50 m)
	• Histórico de passado obstétrico anormal

Figura 5.6 Fatores de risco para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 e gestacional.
Fonte: SBD, 2015-2016.

Tabela 5.5 Metas para critérios para controle glicêmico em adultos e crianças com diabetes.

Dosagens	Adultos		Crianças
	ADA/SBD*	IDF e AACE	
Glicemia pré-prandial (mg/dL)	70-130	< 110	90-180
Glicemia pós-prandial (mg/dL)	< 180 ou < 160*	< 140	< 180
HbA1C (%)	< 7,0	< 6,5	7,5-8,5

Fonte: Joslin, SBD 2015-2016. Federação Internacional de Diabetes e Associação Americana de Endocrinologistas Clínicos.

ENSAIOS LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO E CONTROLE GLICÊMICO

Os ensaios laboratoriais são elementos centrais para o diagnóstico e monitoramento do diabetes. Todas as medidas laboratoriais são suscetíveis a variações pré-analíticas e analíticas, bem como a interferências que podem afetar a interpretação dos testes. Os ensaios de laboratório de rotina envolvidos no diabetes são: a glicemia de jejum, a curva glicêmica ou teste oral de tolerância à glicose (TOTG), a hemoglobina glicada, a frutosamina e o 1,5 anidroglicitol (1,5 AG). É crítico e essencial que laboratórios que realizam testes diagnósticos tenham estabelecido programas de controle de qualidade interno e externo para garantia da qualidade e a manutenção da consistência de resultados confiáveis. É consenso que as determinações laboratoriais para diagnóstico e controle do paciente com diabetes devam ser realizadas em laboratório acreditado.

Glicemia de jejum

Fase pré-analítica

Os três elementos relevantes da fase pré-analítica são o estabelecimento do jejum, os cuidados relacionados ao consumo da glicose na amostra (glicólise), e o conhecimento da variabilidade biológica associada ao ensaio.

Jejum

O tempo mínimo de jejum recomendado é de 8 horas, não devendo ultrapassar 16 horas. Durante o período de jejum o paciente pode receber água à vontade (*ad libitum*). Esse período de jejum é importante para padronizar o ensaio e colocar o paciente o mais próximo possível ao seu ponto de equilíbrio (homeostasia) dos fluxos hormonais que afetam a glicemia.

Inibidores da glicólise

As células sanguíneas, com destaque para os leucócitos, consomem a glicose (glicólise) sanguínea para a obtenção de energia. Portanto, após a coleta de sangue para glicose, se a amostra não for adequadamente tratada, progressivamente terá seu conteúdo de glicose reduzido pela glicólise. Cerca de 5% a 7% da glicose pode ser consumido por hora, dependendo da temperatura ambiente e da contagem de leucócitos, entre outros fatores. É possível, portanto, que um paciente com 126 mg/dL tenha a glicemia reduzida a 110 mg/dL duas horas após, somente pela ação das enzimas da via glicolítica

e, consequentemente, a perda do diagnóstico do diabetes se a glicose da amostra não for corretamente estabilizada. Duas formas clássicas são recomendadas para evitar a perda da glicose por glicólise *in vitro*.

O processo mais conveniente é separar o soro ou plasma das células em período máximo de uma hora após a coleta. Essa amostra pode ser conservada refrigerada por três dias e vários meses no congelador a -20 °C.

Outro método tradicional é coletar o sangue na presença de agentes anti-glicolíticos. Dentre esses agentes, o fluoreto de sódio (2,5 mg/mL de sangue, associado ao EDTA ou oxalato) e o iodoacetato (0,5 mg/mL de sangue, associado à heparina) inibem enzimas da via glicolítica, respectivamente, enolase e gliceroaldeído 3-fosfato desidrogenase, e consequentemente preservam a glicose na amostra de plasma. A inibição por estes agentes antiglicolíticos, no entanto, não é imediata. A inibição com fluoreto só é completa após até 4 horas, resultando em perdas da glicemia (cerca de 8 mg/dL, usualmente). Uma nova mistura antiglicolítica, que inibe a glicólise rapidamente, baseada na acidificação do sangue com tampão citrato está disponível ao laboratório clínico, mas é pouco utilizada no momento.

Variabilidade biológica

As variações de todos os elementos que afetam a concentração de glicose no sangue conferem flutuações a este analito, mesmo em jejum. Os fluxos hormonais e a dieta são os principais responsáveis por estes fluxos, cuja resposta varia entre os indivíduos. Essas flutuações nas concentrações da glicemia, bem como de outros analitos em líquidos biológicos decorrentes destes processos intrínsecos, são chamadas de variabilidade biológica. A variabilidade biológica (VB) pode ser estimada, assumindo que não ocorra variação pré-analítica pela equação:

$$(\text{CV total})^2 = (\text{CV analítico})^2 + (\text{CV biológico})^2$$

Onde CV é o coeficiente de variação (%) que mostra a razão do desvio-padrão com a média da análise (CV analítico = imprecisão analítica) e da variação biológica (CV biológico).

O coeficiente de variação biológico médio intraindividual e interindividual para a glicemia de jejum são parâmetros importantes para interpretar os biomarcadores glicêmicos (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 Variabilidade biológica média para os principais biomarcadores de hiperglicemia.

	Variabilidade biológica média (CV %)	
Analitos	**Intraindividual**	**Interindividual**
Glicemia de jejum	5,7	8,3-12,5
TOTG	16,7	-
HbA1C	1,9	5,7

Fonte: Sacks DB; *et al.*, 2011.

Quando se aplica o coeficiente de variação biológico médio para glicemia de jejum (CVb 5,7%), as concentrações de glicemia de 100 mg/dL e 126 mg/dL, respectivamente valores de corte para glicemia normal e diagnóstico do diabetes, o intervalo de confiança com 95% de probabilidade estima a variação esperada para estes valores. A Figura 5.7 mostra esses efeitos.

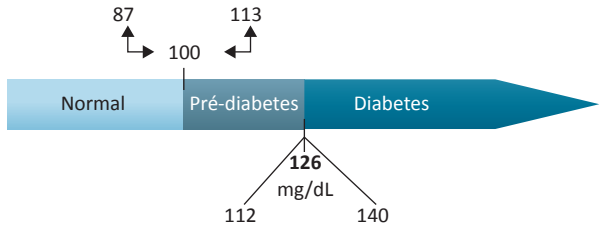


Figura 5.7 Efeito da variabilidade biológica sobre valores de corte associados ao diabetes.
Fonte: Sacks DB; *et al.*, 2011.

Considerando apenas a variabilidade biológica, uma glicemia verdadeira de 100 mg/dL pode variar entre 87 e 113 mg/dL, e uma glicemia de 126 mg/dL varia entre 112 e 140 mg/dL. Portanto, um paciente que apresente uma glicemia de jejum na faixa do intervalo de confiança apresentado deve ter sua glicemia medida em outro momento para confirmar o resultado.

Metodologias para quantificação da glicemia

Duas metodologias para a quantificação da glicemia predominam no laboratório clínico (Figura 5.8). As metodologias com glicose oxidase/Trinder com reação colorimétrica e o ensaio com hexoquinase no ultravioleta são equivalentes no diagnóstico do diabetes.

Embora o ensaio colorimétrico com glicose oxidase seja mais utilizado no Brasil, apresentando reagentes com longa estabilidade, simplicidade metodológica e automação, está sujeito a interferências, principalmente quanto à reação colorimétrica. Esta metodologia, no entanto, não é recomendada para quantificações em líquidos biológicos diferentes do soro/plasma como urina e líquor, exceto quando o reagente, de maior custo, recebeu aditivos que eliminam e minimizam as interferências. O método com hexoquinase-UV apresenta menos interferentes, podendo ser utilizado em todos os líquidos biológicos, e facilmente adaptado à automação. O reagente, porém, é menos estável comparado à glicose oxidase/Trinder e necessita de equipamento para leitura na região UV (340 nm), de maior custo.

Em termos metodológicos para a quantificação da glicemia, tem sido sugerido como aceitável um coeficiente de variação (CV) analítico ≤ 2,2% (imprecisão analítica), sem desvios (zero *bias*). Com base na variabilidade biológica, pode ser aceitável um CV analítico ≤ 2,9%, um bias de ≤ 2,2% e um erro total de ≤ 6,9%.

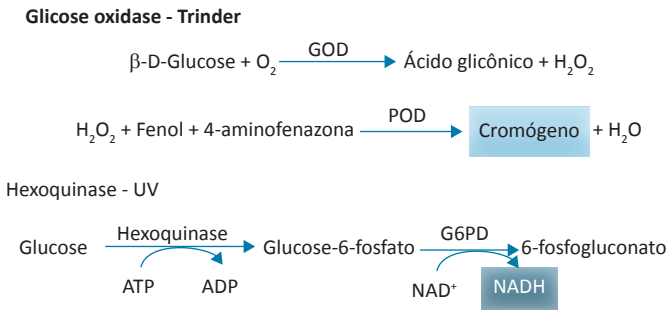


Figura 5.8 Início dos principais ensaios laboratoriais para quantificação da glicemia.
Fonte: Sacks DB; *et al.*, 2011. Rifai N; *et al.*, 2018.

Valor de referência para glicemia de jejum

A concentração de glicose no soro/plasma varia com a idade em indivíduos saudáveis. O valor de referência para crianças, de 60 a 100 mg/dL, é similar ao intervalo para adultos, de 74 a 110 mg/dL. Observe que em nenhuma diretriz para diagnóstico do diabetes os valores de referência são utilizados, mas apenas os valores de corte.

Teste oral de tolerância à glicose

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG), também conhecido como curva glicêmica, tem como princípio administrar uma carga de glicose padronizada e monitorar a glicemia para identificar alterações na liberação de insulina e, consequentemente, o diagnóstico do diabetes. Embora mais sensível que a glicemia de jejum, o teste apresenta baixa reprodutividade, sendo afetado por múltiplos fatores (Tabela 5.7).

A Tabela 5.8 sintetiza os critérios para a interpretação do teste oral de tolerância à glicose, segundo a Organização Mundial da Saúde.

Hemoglobina glicada

A reação não enzimática entre a glicose e a hemoglobina, designada glicação (Figura 5.9), produz a hemoglobina glicada, um marcador para o controle glicêmico, também utilizado no diagnóstico do diabetes.

A reação de formação é lenta e a quantidade de produto formada (HbA1C) depende do tempo de exposição da hemoglobina à glicose. Considerando que o tempo médio de

Tabela 5.7 Características e fatores que afetam o teste oral de tolerância à glicose.

Características	Comentários
O teste deve ser realizado em jejum	Jejum preconizado de 10 a 16h
O teste deve ser realizado pela manhã	O diagnóstico do diabetes pode ser perdido em ensaios realizados no período da tarde
Dieta prévia ao teste com, no mínimo, 150 g de carboidratos	Evitar resultados falso-positivos
Dose de glicose oral	75 g em solução aquosa a 25% (adultos). Tomar a dose em até 5 minutos. 1,75 g de glicose por kg de peso até o máximo de 75 g (crianças).
Suspender o teste na presença de vômitos e diarreia	Fatores que afetam o trânsito intestinal e a absorção da dose de glicose
Interferentes: • Exercícios extenuantes antes do teste • Alterações hormonais (TSH, GH, cortisol e catecolaminas) • Medicamentos: contraceptivos orais, aspirina, ácido nicotínico (tabagismo), diuréticos a agentes hipoglicemiantes.	

Fonte: Sacks DB; *et al.*, 2011.

Tabela 5.8 Critérios para a interpretação do teste oral de tolerância à glicose segundo a Organização Mundial da Saúde.

	Glicemia (mg/dL) dose 75-g glicose oral	
Critérios	Jejum	2h
Normal	< 100	< 140
Glicemia de jejum alterada	> 110 e < 126	< 140
Tolerância à glicose diminuída	< 126	> 140 e < 200
Diabetes *mellitus*	> 126	> 200

Os critérios de jejum e 2 horas devem atender a ambos os critérios.

Fonte: SBD, 2015-2016; ADA 2017.

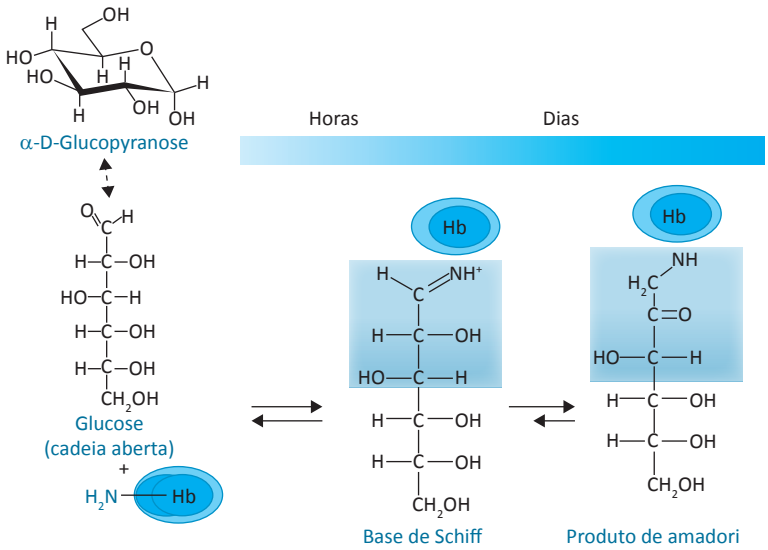


Figura 5.9 Formação da hemoglobina glicada A1C. O grupo aldeído da glicose reage não enzimaticamente com o grupo amino livre da hemoglobina (o resíduo de valina N-terminal da cadeia β na HbA1C) formando uma base de Schiff, que sofre rearranjo e gera uma cetoamina ou produto de Amadori estável, a hemoglobina glicada.

Fonte: Rifai N; *et al.*, 2018.

vida do eritrócito no sangue é de 120 dias, a hemoglobina glicada A1C captura uma média ponderada da glicemia entre seis e oito semanas anteriores ao ensaio (cerca de dois meses).

Outras frações minoritárias provenientes da glicação da hemoglobina com carboidratos intracelulares são conhecidas, como as hemoglobinas glicadas HbA1a, HbA1b, mas a HbA1C, que contempla a ligação com a glicose, representa cerca de 80% da fração glicada da hemoglobina e aquela utilizada no diagnóstico laboratorial. O processo de glicação da hemoglobina não é constante ao longo do tempo, cerca de 50% da Hb glicada ocorre no primeiro mês de vida do eritrócito.

Diferentes métodos estão disponíveis para a quantificação da HbA1C, sendo os mais utilizados os imunoensaios e a cromatografia de troca iônica.

A cromatografia utilizando resinas carregadas positivamente em sistema de HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho) é, no presente, o padrão- ouro para a quantificação da HbA1C.Vários fatores afetam o ensaio de HbA1C (Tabela 5.9).

Para a utilização da HbA1C no diagnóstico do diabetes é consenso que o ensaio deva ser padronizado segundo o DCCT (*Diabetes Control and Complication Trial*) e o laboratório certificado pelo NGSP (*National Glycohemoglobin Standartization Program*), sítio que disponibiliza as informações atualizadas sobre métodos e laboratórios certificados (http://www.missouri.edu/~diabetes/ngsp.html).

A concentração de hemoglobina glicada A1C é expressa em porcentagem na maioria dos laboratórios clínicos. O sistema internacional de unidades (SI) preconiza para a HbA1C

Tabela 5.9 Principais interferentes na determinação da HbA1C.

Fatores que promovem resultados reduzidos de HbA1C
• Anemias hemolíticas
• Hemoglobinopatias (exemplos HbS, HbC, entre outras)
• Comprometimento da medula óssea
• Deficiências nutricionais de ácido fólico, vitaminas B6 e B12
• Hipertireoidismo
• Queimaduras severas com perda de líquidos
• Leucemia
• Mieloma múltiplo
• Presença de concentrações elevadas de vitaminas C e E podem inibir a glicação
Fatores que promovem resultados aumentados de HbA1C
• Presença de hemoglobina carbamilada (ligação com ureia) em pacientes com insuficiência renal
• Deficiência nutricional de ferro
• Presença de hemoglobina acetilada em pacientes que recebem doses elevadas de ácido acetilsalicílico
• Condições que promovam o aumento do número de eritrócitos ou do hematócrito.

Fonte: SBD, 2015-2016.

liberar o resultado em mmol/mol, sendo a conversão realizada pela equação [(HbA1C (%) -2,15) × 10,929]. Sociedades internacionais têm recomendado que, de forma adicional, a HbA1C também seja reportada como glicemia média estimada, valor obtido por meio de estudos que mediram a glicemia média e sua relação com a concentração de HbA1C. A Tabela 5.10 mostra a relação entre esses parâmetros e a equação recomendada para esta conversão.

Os diferentes ensaios laboratoriais para o diagnóstico do diabetes não são iguais. Todos apresentam vantagens e desvantagens, e no presente não há um padrão-ouro para o diagnóstico. A Tabela 5.11 sumariza as principais características dos métodos diagnósticos no diabetes.

Tabela 5.10 Correlação entre HbA1C e glicemia média estimada.

HbA1C (%)	Glicemia média estimada (mg/dL)
5	97
6	126
6,5	140
7	154
8	183
9	212
10	240

Glicemia média esperada (mg/dL) = 28,7 × HbA1C (%) – 46,7.

Fonte: SBD, 2015-2016.

Tabela 5.11 Resumo das principais vantagens e desvantagens dos testes diagnósticos no diabetes.

Testes	Vantagens	Desvantagens
Glicemia de jejum	• Padrão estabelecido • Método rápido simples • Baixo custo • Reprodutível	• Amostra não é estável (glicólise) • Variabilidade biológica elevada • Necessário jejum (inconveniente) • Mede a homeostasia da glicose em um único período de tempo
TOTG	• Padrão estabelecido • Boa sensibilidade	• Amostra não é estável (glicólise) • Variabilidade biológica elevada • Baixa reprodutibilidade • Inconveniente: a glicose é impalatável • Custo maior
HbA1C	• Conveniente (não precisa jejum) • Necessária apenas uma amostra • Reflete a glicemia de longo período (glicemia média)	• Custo elevado do teste • Dosagem afetada por hemoglobinopatias e outras alterações hematológicas • Necessidade de padronizar o ensaio

TOTG, teste oral de tolerância à glicose com 75-g.

Padrão estabelecido tem valores de corte definido para caracterização do diabetes.

Fonte: Adaptada de Sacks *et al.*, 2011.

Outros ensaios laboratoriais associados ao diagnóstico ou monitoramento do diabetes

Frutosamina

A frutosamina reflete a proteína glicada do plasma. Como a albumina é a proteína majoritária (> 50% do total), a frutosamina reflete a glicemia do tempo médio da albumina, cerca de duas a três semanas. O teste apresenta várias interferências e seu uso diagnóstico está, no presente, limitado a situações em que a HbA1C não possa ser utilizada. A determinação específica da albumina glicada, um ensaio novo, ainda não está disponível aos laboratórios clínicos, e tem potencial para ser um bom marcador para controle glicêmico de curto prazo.

1,5 anidroglucitol

O 1,5 anidroglucitol (1,5AG) é um poliol de origem natural, proveniente da dieta, estruturalmente semelhante à glicose, que não é metabolizado pelo organismo. O 1,5AG é excretado pelos rins e compete com a glicose pelos transportadores tubulares renais. Quando a concentração de glicose aumenta no sangue mais 1,5AG é excretado via renal, reduzindo sua concentração sanguínea. A 1,5AG é um biomarcador de glicemia pós-prandial, identificando as "marés glicêmicas", descritas como picos de elevação da glicemia, e associados ao aumento da severidade das complicações do diabetes. As concentrações de 1,5AG séricas refletem a hiperglicemia pós-prandial em período de 24 a 48 horas.

A Tabela 5.12 mostra a relação entre a concentração de 1,5AG com a HbA1C e o *status* do controle glicêmico.

Uso diagnóstico da dosagem de insulina e precursores

O hormônio insulina é sintetizado como pró-insulina, que na sequência é convertido em insulina com a liberação do peptídio C (peptídio de conexão) em quantidade equimolecular. As quantificações de insulina, pró-insulina e peptídio C são empregadas para identificar a capacidade do pâncreas em produzir insulina (reserva pancreática de insulina). Esses peptídios, quantificados por métodos imunométricos, permitem confirmar o diabetes tipo 1 (ausência de produção de insulina). O peptídio C tem como vantagem sobre as outras determinações não apresentar reação cruzada com a insulina, portanto, diferencia-se adequadamente da função pancreática em pacientes que recebem insulina exógena. Outra vantagem do peptídio C é que a molécula persiste em circulação por muito mais tempo que a insulina, o que melhora a sensibilidade do ensaio.

Marcadores de agressão autoimune à célula β

Os principais marcadores de agressão autoimune à célula β são os "anticorpos anti-ilhota", designação genética para qualquer grupo de anticorpos contra estruturas associadas às ilhotas de Langerhans (células produtoras de insulina) ou contra autoantígenos das células β secretoras de insulina. A agressão por autoanticorpos à célula β está presente com elevada frequência nos pacientes com diabetes tipo 1A e LADA.

Vários autoanticorpos contra a insulina, proteínas tirosina-fosfatases, enzimas (como a descarboxilase do ácido glutâmico) e várias estruturas celulares podem ser quantificadas como marcadores autoimunes associados ao diabetes. Dentre esses marcadores, os mais utilizados estão descritos na Tabela 5.13.

Tabela 5.13 Principais marcadores de autoanticorpos contra ilhotas para o diagnóstico do diabetes tipo 1.

Marcadores	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
ICA	70-80	> 99
GAD65	70-80	97-98
IA-2A	60	97-98
IAA	60	95

IAA: *insulin autoantibody* (autoanticorpo anti-insulina); IA-2A: isulinoma 2-*associated autoantibody* (autoanticorpo anti-antígeno 2-associado ao insulinoma); ICA: *islet-cell cytoplasmic autoantibody* (autoanticorpo citoplasmático anti-ilhota); GAD65: *autoantibody against glutamic acid decarboxylase isoform* 65 kDa (autoanticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico, isoforma de 65kDa).

Fonte: Winter WE; *et al*., 2011.

No presente, os autoanticorpos não são recomendados para o diagnóstico do diabetes de rotina. Esses autoanticorpos

Tabela 5.12 Relação entre o 1,5 anidroglucitol a HbA1C e o controle glicêmico.

1,5 anidroglucitol (μg/mL)	Controle do diabetes	HbA1C (%)
> 10	Bom	4-6
5-10	Moderado	6-8
2-5	Ruim	8-10
< 2	Descontrolado	> 10

Fonte: Adaptada de Van Leeuwen; *et al*., 2013.

são usualmente encontrados em 85% a 90% dos pacientes com diabetes tipo 1.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O *Diabetes mellitus* é uma síndrome de múltiplas facetas. O laboratório clínico é a chave para o diagnóstico precoce e para monitorar o controle glicêmico, fator crítico para minimizar as complicações do diabetes e sua severidade. Com o avanço do conhecimento, novos biomarcadores deverão identificar fatores de risco ou de proteção associados ao diabetes com amplos benefícios aos afetados.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. American-Diabetes-Association. Standards of Medical Care in Diabetes 2017. Diabetes Care, 2017, 40, Suppl 1:S11-S24.
2. American-Diabetes-Association. Standards of medical care in diabetes--2013. Diabetes Care. 2013;36 Suppl 1:S11-66.
3. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. Clinical chemistry: principles, techniques, and correlations. 7.ed. Philadelphia: Lippincott Willians & Wilkins, 2013. p.754.
4. Buchanan TA, Xiang A, Kjos SL, et al. What is gestational diabetes? Diabetes Care. 2007;30 Suppl 2:S105-11.
5. Buchanan TA. Screening low-risk women for gestational diabetes mellitus. Let's not muddy the waters further. Diabetes Care. 1999;22(3):535. Epub 1999/03/31.
6. Buzzetti R, Di Pietro S, Giaccari A, et al. High titer of autoantibodies to GAD identifies a specific phenotype of adult-onset autoimmune diabetes. Diabetes Care. 2007;30(4):932-8.
7. Castorino K, Jovanovic L. Pregnancy and diabetes management: advances and controversies. Clin Chem. 2011;57(2):221-30.
8. Chan AY, Swaminathan R, Cockram CS. Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. Clin Chem. 1989;35(2):315-7.
9. Danaei G, Finucane MM, Lin JK, et al. National, regional, and global trends in systolic blood pressure since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 786 country-years and 5.4 million participants. Lancet. 2011;377(9765):568-77.
10. Dods RF. Understanding diabetes : a biochemical perspective. New Jersey: Wiley, 2013. p.389.
11. dos Santos-Weiss IC, Rea RR, Fadel-Picheth CM, et al. The plasma logarithm of the triglyceride/HDL-cholesterol ratio is a predictor of low risk gestational diabetes in early pregnancy. Clin Chim Acta. 2013;418:1-4.
12. Ellard S, Bellanne-Chantelot C, Hattersley AT. Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity--onset diabetes of the young. Diabetologia. 2008;51(4):546-53.
13. Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. N Engl J Med. 2001;345(13):971-80.
14. Fraser CG. Biological variation: from principles to practice. Washington: AACC Press, 2001. p.xii, 151.
15. Fraser CG. The necessity of achieving good laboratory performance. Diabet Med. 1990;7(6):490-3.
16. Furusyo N, Hayashi J. Glycated albumin and diabetes mellitus. Biochim Biophys Acta. 2013;1830(12):5509-14.
17. Gambino R, Piscitelli J, Ackattupathil TA, et al. Acidification of blood is superior to sodium fluoride alone as an inhibitor of glycolysis. Clin Chem. 2009;55(5):1019-21.
18. Gillery P. A history of HbA1c through Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Clin Chem Lab Med. 2013;51(1):65-74.
19. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study: associations with neonatal anthropometrics. Diabetes. 2009;58(2):453-9.
20. Imbeault P, Prins JB, Stolic M, et al. Aging per se does not influence glucose homeostasis: in vivo and in vitro evidence. Diabetes Care. 2003;26(2):480-4.
21. Jaisson S, Leroy N, Desroches C, et al. Interference of the most frequent haemoglobin variants on quantification of HbA: Comparison between the LC-MS (IFCC reference method) and three routinely used methods. Diabetes Metab. 2013;39(4):363-9.
22. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nature. 2006;444(7121):840-6.
23. Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. Diabetologia. 2003;46(1):3-19.
24. Kim WJ, Park CY. 1,5-Anhydroglucitol in diabetes mellitus. Endocrine. 2013;43(1):33-40.
25. Kozak BM, Tjota MY, Close KL. International Diabetes Federation (IDF) highlights growing global impact of diabetes in 5th edition of the Diabetes Atlas. J Diabetes. 2012; 4(1):8-17.
26. Laugesen E, Østergaard JA, and Leslie, RDG. Latent autoimmune diabetes of the adult: current knowledge and uncertainty. Diabet Med. 2015, 32: 843–852.
27. Lima-Oliveira G, Lippi G, Salvagno GL, et al. Transillumination: a new tool to eliminate the impact of venous stasis during the procedure for the collection of diagnostic blood specimens for routine haematological testing. Int J Lab Hematol. 2011;33(5):457-62.
28. Martinello F, Luiz da Silva E. Mechanism of ascorbic acid interference in biochemical tests that use peroxide and peroxidase to generate chromophore. Clin Chim Acta. 2006;373(1-2):108-16.
29. Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, et al. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. Diabetes Care. 2010;33(3):676-82.
30. Mossine VV, Mawhinney TP. 1-Amino-1-deoxy-D-fructose ("fructosamine") and its derivatives. Adv Carbohydr Chem Biochem. 2010;64:291-402.
31. Murphy R, Ellard S, Hattersley AT. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2008;4(4):200-13.
32. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. Diabetes Care. 2009;32(1):193-203.
33. Rifai N, Horvarth AR, Wittwer CT. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 6.ed., St. Louis: Elsevier, 2018. p. 1176-1189.
34. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Clin Chem. 2011;57(6):e1-e47.
35. Sacks DB, Fonseca V, Goldfine AB. Diabetes: advances and controversies. Clin Chem. 2011;57(2):147-9.

36. Sacks DB. A1C versus glucose testing: a comparison. Diabetes Care. 2011;34(2):518-23.
37. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature. 2001;414(6865): 799-806.
38. Selvin E, Crainiceanu CM, Brancati FL, et al. Short-term variability in measures of glycemia and implications for the classification of diabetes. Arch Intern Med. 2007;167(14):1545-51.
39. Sociedade-Brasileira-de-Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2015-2016. Barueri: Grupo Editorial Nacional, 2016. p.5-12.
40. Steck AK, Rewers MJ. Genetics of type 1 diabetes. Clin Chem. 2011;57(2):176-85.
41. Stenson K, Heimer G, Lundh C, et al. The prevalence of violence investigated in a pregnant population in Sweden. J Psychosom Obst Gynaecol. 2001;22(4):189-97.
42. Van Leeuwen, A.; Poelhuis-Leth, D.; Bladh, M. Davis's Comprehensive Handbook of Laboratory and Diagnostic Tests With Nursing Implications. Philadelphia: F.A. Davis Company, 2013, p.856.
43. Weinert LS. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy: comment to the International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel. Diabetes Care. 2010;33(7):e97; author reply e8.
44. Westgard JO, Darcy T. The truth about quality: medical usefulness and analytical reliability of laboratory tests. Clin Chim Acta. 2004;346(1):3-11.
45. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. Diabetes Res Clin Pr. 2011;94(3):311-21.
46. Winter WE, Schatz DA. Autoimmune markers in diabetes. Clin Chem. 2011;57(2):168-75.
47. Won JC, Park CY, Park HS, et al. 1,5-Anhydroglucitol reflects postprandial hyperglycemia and a decreased insulinogenic index, even in subjects with prediabetes and well-controlled type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract. 2009;84(1):51-7.
48. Xiang AH, Kawakubo M, Buchanan TA, et al. A longitudinal study of lipids and blood pressure in relation to method of contraception in Latino women with prior gestational diabetes mellitus. Diabetes Care. 2007;30(8):1952-8.
49. Yamanouchi T, Inoue T, Ogata E, et al. Post-load glucose measurements in oral glucose tolerance tests correlate well with 1,5-anhydroglucitol, an indicator of overall glycaemic state, in subjects with impaired glucose tolerance. Clin Sci (Lond). 2001;101(3):227-33.

6

capítulo

Marileia Scartezini

Dislipidemias

INTRODUÇÃO

Os lípides, ou lipídios, são substâncias orgânicas caracterizadas pela insolubilidade no meio aquoso. Os principais lípides são: colesterol livre (CL), colesterol esterificado (CE), triglicérides ou triacilglicerol (TG), fosfolípides (FL) e ácidos graxos livres (AGL).

O colesterol é o precursor dos hormônios esteroides, dos ácidos biliares, da vitamina D e tem importantes funções nas membranas celulares, influenciando na sua fluidez e no estado de ativação de enzimas ligadas às membranas. Os triglicérides, formados a partir de três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol, e os ácidos graxos livres, são importantes fontes de energia para uso imediato ou posterior armazenamento, depositados nos tecidos adiposo e muscular. Os fosfolípides compõem a estrutura básica das membranas celulares.

Os ácidos graxos (AG) da nossa dieta podem ser classificados como saturados, aqueles sem duplas ligações entre seus átomos de carbono, mono ou polinsaturados, de acordo com o número de duplas ligações na sua cadeia. Os AG saturados mais frequentes em nossa alimentação são: láurico, mirístico, palmítico e esteárico, variando de 12 a 18 átomos de carbono. O mais frequente dos AG monoinsaturados é o ácido oleico, que contém 18 átomos de carbono. Entretanto, os AG polinsaturados podem ser classificados como ômega-3 (eicosapentaenoico, docosahexaenoico e linolênico), ou ômega-6 (linoleico) de acordo com presença da primeira dupla ligação, a partir do grupo hidroxila, entre os carbonos.

As lipoproteínas (LP) são macromoléculas constituídas de uma fração lipídica e uma proteica, designada apolipoproteína (apoLP). As LP promovem o transporte dos lípides na circulação linfática, no interstício celular e no sangue. Porém, a albumina é o principal carreador dos ácidos graxos livres.

As partículas de lipoproteínas organizam-se naturalmente, contendo um núcleo hidrofóbico com CE e TG e uma superfície hidrofílica composta de CE, FL e apoLP. As diversas apolipoproteínas que compõem a superfície das LP garantem a solubilidade, a estrutura e o direcionamento de todo o metabolismo lipoprotéico.

As lipoproteínas são classificadas em cinco tipos, de acordo com a sua composição em lípides e apolipoproteínas, caracterizando-se em diferentes tamanhos, composição, densidade, carga elétrica e conformação estrutural. Essas diferenças permitem a separação das lipoproteínas por diversos procedimentos e o princípio da ultracentrifugação foi utilizado para a atual nomenclatura, no qual, quanto maior o teor lipídico menor é a densidade e, quanto maior é a fração proteica, maior é a densidade.

As características das principais classes de lipoproteínas e apolipoproteínas são descritas a seguir.

O quilomícrom (QM) é a maior e menos densa partícula, com alto teor de triglicérides provenientes da dieta, além do colesterol absorvido, este último tanto pela fonte alimentar quanto pela sua concentração na secreção biliar, bem como as vitaminas lipossolúveis. O teor em FL depende da sua síntese no enterócito e da absorção alimentar e biliar, com o auxílio de fosfolipases intestinais e pancreáticas.

A VLDL (*very low density lipoprotein*), ou lipoproteína de densidade muito baixa, é uma partícula grande, porém menor que o QM, leve, e nela predomina o TG de origem hepática.

A IDL (*intermediate density lipoprotein*), ou lipoproteína de densidade intermediária, tem teor lipídico intermediário entre a VLDL e a LDL.

A LDL (*low density lipoprotein*), ou lipoproteína de densidade baixa, é a principal carreadora de colesterol na circulação para suprir os tecidos periféricos com este.

A HDL (*high density lipoprotein*), ou lipoproteína de densidade alta, é a menor lipoproteína com maior teor em proteína e menor em lípides (FL e CE). Apresenta-se em subfrações, com propriedades metabólicas diferentes, onde a pré-βHDL é a nascente ou precursora das partículas de HDL3 e HDL2.

A lipoproteína (a) [Lp(a)] resulta da associação covalente por pontes bissulfeto entre a apo B-100, da partícula de LDL, e uma proteína de alto peso molecular, a apo (a), que apresenta homologia estrutural com o plasminogênio. Essa união acontece na membrana externa do hepatócito ou no plasma, por mecanismo ainda não demonstrado. A partícula de Lp(a) não é removida pelos receptores hepáticos de LDL. A função fisiológica da Lp(a) não é conhecida, mas ela tem sido associada à formação e à progressão da placa aterosclerótica. Sua

concentração no soro humano é geneticamente determinada e sofre pouca influência de dieta, fármacos ou estilo de vida.

As apolipoproteínas atuam na formação e exportação das lipoproteínas das células, reconhecem os receptores celulares para a entrega dos lípides e atuam como cofatores para proteínas e enzimas envolvidas no metabolismo dos lípides, no plasma e nos tecidos. As apoLP que apresentam funções conhecidas são representadas pelas famílias das apo A, B, C e E.

As apo A, especialmente a apo A-I, são as principais constituintes das HDL, participam da remoção do colesterol das células (transporte reverso do colesterol) e possuem ações anti-inflamatórias, antioxidantes, antitrombogênicas e vasodilatadoras.

A apo B é representada pela apo B-100 e pela apo B-48. São proteínas estruturalmente importantes nas lipoproteínas, e encontramos apenas uma molécula de apo B-100 em cada partícula de VLDL, IDL e LDL, e uma apo B-48 no QM, sendo que a determinação plasmática da apo B estima o número de partículas aterogênicas circulantes. A apo B é reconhecida pelos receptores B-E e no plasma humano mais de 95% dessas apolipoproteínas são representadas pela apo B-100. Em indivíduos saudáveis, encontramos cerca de 80 mg/dL de apo B-100 no soro, em jejum ou pós-prandial, e em hiperlipidêmicos essa concentração pode estar duplicada.

As apo C são importantes moduladoras da enzima lipoproteína lipase (LPL), sendo que a apo C-II a estimula e a apo C-III a inibe. A eficiência da ação da LPL, que atua na hidrólise do TG no Q e na VLDL, depende da concentração da apo C nas lipoproteínas QM, VLDL e IDL.

As apo E são responsáveis por estimular a captação de QM, VLDL e LDL e por interagir com receptores celulares específicos, em especial no tecido hepático, mas também no adiposo, muscular e em macrófagos. A apo E apresenta variações no seu fenótipo, devido ao polimorfismo em sua constituição proteica (E-2, E-3, e E-4), o que está associado com diferentes concentrações de colesterol, nas populações, devido à afinidade seletiva pelo receptor de LDL (B-E). Foi descrito, também, a associação destes polimorfismos com o risco para a doença de Alzheimer.

Metabolismo dos lípides e lipoproteínas

Como as gorduras da dieta são absorvidas?

As gorduras provenientes da dieta são absorvidas inicialmente, solubilizadas por ácidos biliares conjugados de síntese hepática, e formam estruturas chamadas micelas. As lipases e colipases do suco pancreático garantem a digestão das gorduras pelo acesso facilitado às micelas.

Os ácidos biliares conjugados, cerca de 95%, são absorvidos no íleo terminal por transportadores específicos designados IBAT (*intestinal bile acid transporter*) e são transportados ligados com a albumina, via circulação portal para o fígado.

O colesterol da luz intestinal é absorvido, em 50%, no duodeno e na porção proximal do jejuno, passivamente. Aproximadamente 1 g de colesterol e cerca de 20 g a 24 g de ácidos biliares chegam ao intestino pela bile, diariamente. Normalmente, a quantidade de colesterol dos alimentos perfaz de 0,2 a 0,3 g/dia.

O transporte do colesterol da luz intestinal para o enterócito é facilitado pela proteína NPC1L1 (*Niemann-Pick C1 like 1 protein*), localizada na membrana apical. A inibição da proteína NPC1L1 já é o alvo terapêutico de um fármaco, para reduzir a absorção intestinal do colesterol, no tratamento da hipercolesterolemia.

Os fitoesteróis da dieta competem com o colesterol na formação das micelas, devido à maior afinidade, e em seguida competem pelo transporte mediado pela NPC1L1.

O colesterol livre na célula da mucosa intestinal, no jejuno, é esterificado pela enzima ACAT-2 (*acyl-CoA-cholesterol acyl transferase-2*), localizada no retículo endoplasmático. O colesterol pode ser exportado para a circulação portal por meio do transportador ABCA-1 (*ATP-binding cassette transporter A1*), localizado na membrana basolateral do enterócito, contribuindo para a formação da HDL precursora.

O ciclo entero-hepático da bile e do colesterol reinicia-se quando estes forem excretados por transportadores hepáticos específicos, ABCG5/8 (*ATP-binding cassette sub-family G member 5 and 8*), para serem agregados em micelas.

A maior parte da gordura alimentar constitui-se de TG, principalmente os de cadeia longa, com 16 átomos de carbono ou mais, e de 5% de FL. As partículas de TG na luz intestinal não atravessam a membrana do enterócito e precisam sofrer a hidrólise parcial pelas lipases gástrica, intestinal e pancreática, formando mono e diacilglicerol, além de ácidos graxos livres. Dessa forma, são absorvidos passivamente na vilosidade intestinal (duodeno e jejuno) após ligação com uma proteína LBP (*lipid binding protein*) e são re-esterificados com produção de di e triglicérides.

As vias do metabolismo das lipoproteínas são complexas e inter-relacionadas em múltiplas etapas. O processo inicia com a entrega dos lípides da dieta aos tecidos periféricos e fígado, chamada via exógena. Na sequência, pela via endógena, no tecido hepático, ocorre a união dos lípides da dieta e de síntese endógena ("de novo"), para serem encaminhados aos tecidos extra-hepáticos. O colesterol plasmático é controlado pela via do receptor LDL nos tecidos periféricos e removido pelo transporte reverso na HDL, retornando ao fígado para posterior eliminação.

Como os lípides da dieta chegam aos tecidos periféricos e fígado?

A via exógena tem como função a entrega dos lípides da dieta aos tecidos periféricos e ao fígado.

No enterócito, a proteína microssomal de transferência, ou MTP (*microssomal transfer protein*), transfere TG e FL para dentro da cisterna e é o componente mais importante na regulação, no empacotamento e na secreção da apo B-48.

Os triglicérides são transportados por meio da proteína microssomal MTP ao aparelho de Golgi, acrescidos do conjugado de colesterol, FL com a apo B-48, e apo A, C e E, para formar a lipoproteína QM, que é liberada à linfa intestinal.

Os QM seguem pelo ducto torácico e atingem a circulação sanguínea, sofrendo a ação da LPL que hidrolisa o TG e FL, com liberação de monoglicérides, ácidos graxos e lisolecitinas. O tamanho dos QM se reduz e passam a ser chamados de quilomícrons remanescentes (QMrem), que são removidos da circulação, rapidamente, pelos receptores B-E, receptor E e receptor proteína análoga ao receptor de LDL (LRP), no tecido hepático.

Metabolismo endógeno

A via endógena envolve a entrega dos lípides que foram recebidos da dieta e os de síntese hepática, para serem organizados e empacotados no fígado, para chegarem às células periféricas.

Os lípides de síntese endógena no fígado, principalmente TG, FL e colesterol, são conjugados à molécula de apo B-100 nascente por intermédio da proteína microssomal MTP, do fator 1 de ribosilação de ADP (*ADP ribosylation fator 1 – ARF-1*) e da fosfolipase D, permitindo a formação da lipoproteína VLDL. O agrupamento hepático da VLDL também vem sendo estudado como alvo terapêutico no tratamento da hipercolesterolemia, tanto na inibição da síntese da apo B como na inibição da proteína microssomal MTP. O fígado libera a VLDL na circulação e, de modo análogo ao QM, sofre a ação da LPL, transformando-se em IDL ou remanescentes de VLDL e, posteriormente, em LDL.

Durante a hidrólise do TG, na VLDL, as apo C são transferidas de volta para a lipoproteína HDL. As partículas de IDL, contendo apo E, ligam-se aos receptores hepáticos e são removidas em cerca de 50%.

Parte do material da superfície da IDL, fosfolípides, colesterol livre e apolipoproteínas, são transferidos para a HDL ou formarão HDL "de novo" na circulação. Os ésteres de colesterol são transferidos da HDL para a VLDL pela ação da enzima CETP (*cholesterol ester transfer protein*); em troca, ocorre a substituição de partículas de TG, no centro da VLDL nascente, por partículas de ésteres de colesterol. Isso explica porque a LDL formada no final dessa cascata é rica em CE. A IDL restante continua sofrendo hidrólise, removendo o TG remanescente e transferindo as apolipoproteínas para as outras lipoproteínas, exceto a apo B100, que levará à formação das partículas de LDL circulantes. A alteração na enzima CETP vem sendo testada como alvo terapêutico no tratamento de concentrações de HDL-C baixo e na redução do risco cardiovascular.

As lipoproteínas LDL retornam no fígado, ou chegam aos tecidos extra-hepáticos, pelos receptores de LDL, mas quando em excesso infiltram-se na parede dos vasos, acumulando-se e iniciando o processo de aterosclerose.

Controle do colesterol plasmático via receptores de LDL

A lipoproteína LDL é removida do plasma pela sua ligação no receptor de LDL ou receptor B-E. Os receptores de LDL são glicoproteínas de superfície celular e desempenham função relevante na homeostase do colesterol plasmático.

Os receptores de LDL (B-E), descritos por Goldstein e Brown, são acoplados por uma proteína adaptadora ARH (*autossomal receptor hypercholesterolemia*) à maquinaria endocítica, na região da cavidade revestida. Essa proteína ARH é essencial para o processo de endocitose da LDL e algumas mutações neste gene estão associadas com a elevação do colesterol sérico.

Os receptores LDL presentes nas membranas plasmáticas reconhecem e ligam a apo B100, da LDL. Mutações nos genes, do receptor LDL ou da apo B100, causam Hipercolesterolemia Familiar (HF), uma das dislipidemias mais severas e mais frequentes, pela redução na captação da LDL do plasma.

As partículas de LDL são internalizadas e formam um endossoma, que dissocia a lipoproteína LDL do receptor LDL, o qual retorna à superfície da membrana para ser reutilizado pela célula. A apo B no lisossoma é degradada em peptídios e aminoácidos. Os ésteres de colesterol são hidrolisados e o colesterol livre está disponível para a síntese de membrana celular, hormônios esteroides nos tecidos endócrinos ou síntese de ácidos biliares no fígado. As células possuem a habilidade de regular a concentração de colesterol intracelular, mecanismo relevante dessa molécula quando em excesso. Uma quantidade elevada de colesterol livre resultará em decréscimo da síntese endógena de colesterol, pela inibição do HMGCoA redutase (β-*hidroxi*-β-*methyl-glutaril coenzima A redutase*), aumentando a esterificação do colesterol pela ACAT (*acyl-cholesterol-acyl-transferase*) e a inibição da síntese de novos receptores de LDL, pela supressão da transcrição do gene do receptor LDL.

Os mecanismos moleculares envolvidos na homeostase celular do colesterol foram compreendidos graças à identificação do fator de transcrição SREBP-2 (*sterol regulatory element binding protein*), ou proteína de ligação ao elemento responsivo a esteroide. Essa proteína SREBP migra na forma complexada, do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi e sofre duas clivagens proteolíticas por proteases, liberando um fragmento ativo. Esse fragmento de SREBP migra para o núcleo onde atua e estimula a transcrição de genes envolvidos no metabolismo lipídico, entre eles o receptor B-E e a HMG-CoA redutase. Essa minuciosa regulação permite o ajuste estreito na concentração intracelular do colesterol. Na presença de esteroides no meio intracelular não há migração da SREBP para o Golgi, não liberando a porção ativa, ou fragmento ativo, da proteína.

A mais recente descoberta no metabolismo dos lípides é a regulação da quantidade de receptor de LDL nas células pela proteína PCSK9 (*Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9*), ou pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9, uma protease que se expressa no fígado, intestino e rins. A PCSK9 está envolvida na regulação da degradação do receptor LDL, no lisossomo das células, após a internalização do complexo PCSK9/receptor LDL do plasma, impedindo que o mesmo recicle para a superfície celular, resultando em um menor número de receptores de LDL nas células e um aumento de LDL no plasma.

Foram descritas mutações no gene da PCSK9 associadas com o ganho de função, onde ocorre um aumento na degradação do receptor, promovendo a elevação acentuada da colesterolemia. Esse tipo de mutação está presente em menos de 2% dos pacientes com diagnóstico clínico para HF no Reino Unido.

Mutações que promovem a perda de função, no gene da PCSK9, diminuem a degradação do receptor, permitindo maior captação da LDL e diminuindo o LDL-C no plasma. A variante R46L do gene PCSK9 codifica a substituição da arginina pela leucina na posição 46 e está associada com os níveis reduzidos de colesterol no plasma e o perfil lipídico de baixo risco para a Doença Arterial Coronariana (DAC), em homens saudáveis do Reino Unido.

A quantificação da PCSK9 no plasma pode ser uma estratégia simples na indicação dos indivíduos portadores de mutação neste gene. O ensaio, no entanto, está disponível apenas para pesquisa no presente.

Embora as estatinas aumentem o número de receptores de LDL na célula, simultaneamente elevam a concentração da PCSK9 e isso justifica o porquê da ação limitada dessa droga ao dobrar a dose no paciente, um adicional de 6% a mais na redução do LDL-C. Portanto, o efeito redutor da estatina fica prejudicado e poderia ser maior se a PCSK9 não degradasse o receptor. Esse fato permitiu que a indústria farmacêutica procurasse uma intervenção farmacológica para inibir a PCSK9, na forma de anticorpos monoclonais, RNA antissentido e peptídios miméticos, para aumentar a eficácia da estatina na terapêutica da hipercolesterolemia.

Várias companhias farmacêuticas desenvolveram os anticorpos anti-PCSK9 e, até agora, três já foram aprovados e liberados: Amgen (evolocumabe), Sanofi/Regeneron (alirocumabe) e Pfizer (bococizumabe). Todos são administrados por via subcutânea, uma ou duas vezes por mês, dependendo da concentração com que se apresenta o anticorpo . Os estudos clínicos demonstraram que são bem tolerados e produziram acentuada redução do LDL-C, cerca de 60% a 70%, quando combinados com a estatina No Brasil, já foi liberado e está sendo comercializado o anticorpo anti-PCSK9, indicado para o tratamento da hipercolesterolemia grave ou no alto risco da doença cardiovascular.

Transporte reverso do colesterol pela HDL

O transporte reverso do colesterol é a maneira pelo qual esta molécula, presente nos tecidos periféricos e na íntima arterial, é removida pela lipoproteína HDL e transportada ao fígado para a sua eliminação na bile e excreção fecal, ou é levada às gônadas e à suprarrenal ou adrenal, para síntese hormonal.

Essa via começa quando a HDL é secretada pelo fígado e pelo intestino como partícula nascente, na forma discoidal, que contém fosfolípides e apo A.

Também, no processo de hidrólise das partículas ricas em TG, pelas LPL, surgem projeções de componentes de superfície das LP, contendo CL, FL e apo C e A, decorrentes da diminuição no volume dessas partículas. Essas projeções desprendem-se como se fossem "dedos de luvas", dando origem às pré-βHDL ou HDL nascentes, de estrutura lamelar, e são ótimas incorporadoras de colesterol celular.

O colesterol livre das membranas é transferido para a HDL nascente pelo processo passivo, difusão aquosa, mas ocorre por transportador específico chamado de ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter A1*), que facilita a extração do colesterol das células pela HDL. O receptor hepático, SR-B1 (*scavenger receptor class B member 1 [SRB1] or SR-BI*), permite o efluxo do colesterol das várias formas de partículas de HDL. Uma vez que o colesterol seja entregue para a HDL, independente do mecanismo, imediatamente este é esterificado pela LCAT (*lecithin-cholesterol acyl transferase*), na presença do cofator, apo AI, no plasma.

À medida que o colesterol livre é esterificado, as lipoproteínas HDL aumentam gradativamente de tamanho, assumindo formato próximo a uma esfera, sendo denominada HDL3. Mediante trocas de componentes lipídicos com outras lipoproteínas no plasma, por intermédio da CETP, as HDL3 se enriquecem de TG e são denominadas HDL2. Entretanto, esse processo é contínuo, o que gera frações intermediárias de HDL.

Em síntese, o sistema que entrega o colesterol ao fígado é dividido em várias etapas que incluem: 1) remoção do colesterol intracelular pela HDL nascente ou pré-βHDL; 2) esterificação do colesterol pela LCAT no plasma; 3) captação seletiva de CE, da HDL, pelos receptores SR-BI no fígado, gônadas e adrenais; 4) transferência de CE da HDL, pela CETP, para as LP que contêm apo B; 5) captação de LP que contêm apo B pelos receptores B-E no fígado.

Classificação das dislipidemias

As dislipidemias são alterações das concentrações dos lípides no sangue, ou no plasma sanguíneo, quer seja pelo aumento ou pela diminuição do Colesterol Total (CT), frações do colesterol (LDL-C, HDL-C) e Triglicérides (TG).

Não existe um esquema perfeito ou ideal, na literatura, para classificar as doenças resultantes das alterações do metabolismo dos lípides e lipoproteínas.

As dislipidemias podem ser classificadas, de acordo com a sua etiologia, em dois tipos: as de origem primária ou genética, onde ocorrem alterações, ou mutações, nos genes que codificam a sequência para uma apolipoproteína, um receptor ou uma enzima que participam no metabolismo das lipoproteínas.

As principais causas das dislipidemias primárias e sua incidência na população estão na Tabela 6.1, adaptada de Quintão, E. e cols., 2011.

As dislipidemias secundárias são desencadeadas por outras doenças, medicamentos ou fatores ambientais, e estão classificadas na Tabela 6.2, de acordo com as alterações dos lipídios séricos.

O diagnóstico da dislipidemia primária deve ser realizado posteriormente à investigação das causas da dislipidemia secundária, estas com maior prevalência na população.

Tabela 6.1 Dislipidemias primárias e sua incidência na população.

Dislipidemia	Causa	Incidência	Manifestação clínica
Hipercolesterolemia familiar	Mutação do receptor B-E heterozigose homozigose	1:500* 1:1.000.000	Hipercolesterolemia
Defeito familial de apo B-100	Mutação em apo B-100	1:1000	
Hipercolesterolemia poligênica	Não identificada	1%-5%	
Hiperlipidemia familial combinada	Não identificada	1%-2%	
Hipercolesterolemia autossômica recessiva (ARH)	Mutação da proteína adaptadora do receptor de LDL (ARH)	Muito rara	
Hipercolesterolemia PCSK9	Mutação com ganho de função da PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin Kexin type 9)*	Muito rara	
Hiperlipidemia familial combinada	Não identificada	1%-2%	Hipertrigliceridemia
Hipertrigliceridemia familial	Não identificada	1:300	
Hiperquilomicronemia	Mutação de LPL ou de apoC-II	1:1.000.000	
Hiperlipidemia familial combinada	Não identificada	1%-2%	Hipercolesterolemia Hipertrigliceridemia
Disbetalipoproteinemia	Mutação de apo E	Muito rara	
Abetalipoproteinemia	Mutação em MTP	Muito rara	Hipocolesterolemia
Hipobetalipoproteinemia	Mutação em apo B		
Hipocolesterolemia PCSK9	Mutação com perda de função da PCSK9	Muito rara	
Hipoalfalipoproteinemia familial	Não conhecida	1:400	HDL-c reduzido
Deficiência de apo A-1	Mutação em gene da apoA-1	Muito rara	
"*Fish eye disease*" e Deficiência parcial de LCAT	Deficiência de LCAT	Muito rara	
Doença de Tangier e Deficiência familial de HDL	Mutação no gene do ABCA-1	Muito rara	
Hiperalfalipoproteinemia	Mutação na CETP, superexpressão de apo A-1ou causa desconhecida	Muito rara	HDL-c elevado

* 1:200 a 1:250, sugestão de estudos genéticos recentes.

Fonte: Adaptada de Quintão, Nakandakare e Passarelli, 2011.

A classificação laboratorial das dislipidemias, considerada na V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e na Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose/2017, é dividida em quatro tipos: 1) Hipercolesterolemia isolada (LDL-C ≥ 160 mg/dL); 2) Hipertrigliceridemia isolada (TG ≥ 150 mg/dL ou ≥ 175 mg/dL, se a amostra for obtida sem jejum); 3) Hiperlipidemia mista (LDL-C ≥ 160 mg/dL e TG ≥ 150 mg/dL ou ≥ 175 mg/dL, se a amostra for obtida sem jejum). Se TG ≥ 400 mg/dL, o cálculo do LDL-C pela fórmula de Friedewald é inadequado, devendo-se, então, considerar a hiperlipidemia mista quando o não HDL-C ≥ 190 mg/dL; 4) Hipolipidemia por redução do HDL-C (homens < 40 mg/dL e mulheres < 50 mg/dL) isolada ou em associação ao aumento de LDL-C ou de TG.

A classificação proposta por Fredrickson teve por base a separação eletroforética e/ou por ultracentrifugação das frações de lipoproteínas combinada com o aspecto do soro ou plasma, em repouso na geladeira, durante a noite. Foi amplamente empregada e permitiu correlacionar síndromes de doenças clínicas, muitas das quais de origem hereditária, a

Tabela 6.2 Principais causas de dislipidemias secundárias de acordo com a alteração do lipídio sérico.

• Aumento de LDL-C	• Diuréticos
• Hipotireoidismo	• Betabloqueadores
• Síndrome Nefrótica	• Estrógenos
• Hepatopatia	• Anticoncepcionais orais
• Colestase	• Síndrome de Cushing
• Anorexia nervosa	• Diabetes *mellitus*
• Deficiência de hormônio do crescimento	• Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
• Porfiria aguda	• Diminuição do HDL-C
• Aumento de TG	• Síndrome metabólica
• Síndrome metabólica	• Sedentarismo
• Excesso de álcool	• Tabagismo
• Obesidade	• Diabetes *mellitus*
• Gravidez	• Obesidade
• Hipotireoidismo	• Hipertrigliceridemia
• Insuficiência renal	

Fonte: Adaptada de Quintão, Nakandakare e Passarelli, 2011.

uma avaliação laboratorial. A classificação de Fredrickson não quantifica proteína e nem avalia o HDL-C, por isso não está sendo mais empregada, embora a nomenclatura para algumas síndromes tenha permanecido. Também, esta classificação não diferencia as hiperlipidemias primárias das secundárias.

Na Tabela 6.3 estão descritos os principais achados laboratoriais no soro de pacientes de acordo com a classificação em fenótipos de Fredrickson.

Tabela 6.3 Caracterização do soro lipêmico pela classificação de Fredrickson.

Classificação de Fredrickson	CT (mg/dL)	TG (mg/dL)	Aparência do soro mantido em repouso de 12 horas (colhido em jejum)
Normal	< 200	< 150	Límpido
I	< 260	< 1.000	Anel cremoso no sobrenadante; infranadante límpido
IIa	> 300	< 150	Límpido
IIb	> 300	150-300	Levemente turvo
III	350-500	350-500	Turvo, com anel cremoso tênue, quase imperceptível
IV	< 260	200-600	Turvo a leitoso
V	> 300	> 1.000	Leitoso com anel cremoso no sobrenadante; infranadante turvo

Fonte: Adaptada de Quintão, Nakandakare e Passarelli, 2011.

Diretrizes e diagnóstico laboratorial das dislipidemias

As Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias (III, IV, V e a Atualização/2017), documentos emitidos pela Sociedade Brasileira de Cardiologia em 2001, 2007, 2013 e 2017, estabeleceram critérios para orientar o desempenho do laboratório na dosagem do perfil lipídico (CT, TG, LDL-C e HDL-C), proporcionando confiabilidade para estimar o risco para a Doença Arterial Coronariana (DAC). Participaram alguns representantes da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) e da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (SBPC/ML), que orientaram sobre o preparo do paciente para realizar o exame do perfil lipídico e as possíveis interferências nos resultados laboratoriais.

Várias alterações foram indicadas em 2013, na V Diretriz Brasileira de Dislipidemias, e o jejum foi dispensado para a análise de CT, HDL-C, Apo B e Apo A-I e foram mantidas 12h de jejum para o TG e LDL-C calculado. Foi referendado o uso do parâmetro colesterol não HDL (não -HDL-C), com a finalidade de estimar a quantificação de lipoproteínas aterogênicas circulantes no plasma em indivíduos com hipertrigliceridemia. O colesterol não HDL representa a fração do colesterol nas outras lipoproteínas, exceto da HDL, e é estimado subtraindo-se o valor do HDL-C do CT, portanto, colesterol não HDL = CT- HDL-C.

Vários artigos científicos anteciparam a recomendação para liberar o jejum nos laboratórios clínicos e serviram de base para as Diretrizes Europeias da Federação Europeia de Química Clínica e Medicina Laboratorial e da Sociedade Europeia de Aterosclerose, em 2016. Essa Diretriz analisou diversos estudos realizados por pesquisadores da Universidade de Copenhague, envolvendo 300.000 pacientes de países como Canadá, Estados Unidos e Dinamarca. Ficou confirmado não haver alterações significativas para o exame do perfil lipídico entre os grupos de pacientes com jejum quando comparados com os pacientes sem jejum prévio, em adultos, crianças e adolescentes. Várias evidências científicas demonstraram que a coleta de sangue para medir o perfil lipídico depois de uma refeição é mais adequada para refletir a situação metabólica habitual do paciente.

Em outubro de 2016, um grupo de especialistas brasileiros em dislipidemias referendou a flexibilização do tempo de jejum para o perfil lipídico e divulgou o documento "Consenso Brasileiro para a Normatização da Determinação Laboratorial do Perfil Lipídico", com o apoio das cinco (5) Sociedades Brasileiras: de Cardiologia (SBC), de Análises Clínicas (SBAC), de Patologia Clínica (SBPC/ML), de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) e de Diabetes (SBD);

Complementando, foi publicado na revista da SBC, Arquivos Brasileiros de Cardiologia, o artigo "Posicionamento sobre a Flexibilização do Jejum para o Perfil Lipídico", com a divulgação das novas normas de coleta de amostra e os novos valores referenciais e de alvo terapêutico, conforme avaliação de risco cardiovascular estimado pelo médico solicitante do perfil lipídico, para adultos > 20 anos na Tabela 6.4. Os valores referenciais desejáveis do perfil lipídico para crianças e adolescentes estão na Tabela 6.5.

Tabela 6.4. Valores referenciais e de alvo terapêutico conforme avaliação de risco cardiovascular estimado pelo médico solicitante do perfil lipídico para adultos > 20 anos.

Lípides	Com jejum (mg/dL)	Sem jejum (mg/dL)	Categoria referencial
Colesterol total*	< 190	< 190	Desejável
HDL-C	> 40	> 40	Desejável
Triglicérides**	< 150	< 175	Desejável
			Categoria de risco
LDL-C	< 130	< 130	Baixo
	< 100	< 100	Intermediário
	< 70	< 70	Alto
	< 50	< 50	Muito alto
Não HDL-C	< 160	< 160	Baixo
	< 130	< 130	Intermediário
	< 100	< 100	Alto
	< 80	< 80	Muito alto

* CT› 310 mg/dL considerar a probabilidade de hipercolesterolemia familiar.

**Quando os níveis de triglicérides estiverem acima de 440 mg/dL (sem jejum) o médico solicitante fará outra prescrição para a avaliação de TG com jejum de 12h e será considerado um novo exame de triglicérides pelo laboratório clínico.

Fonte: Adaptada do Posicionamento sobre a Flexibilização do Jejum para o Perfil Lipídico. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2017.

Tabela 6.5 Valores referenciais desejáveis do perfil lipídico para crianças e adolescentes.

Lípides	Com jejum (mg/dL)	Sem jejum (mg/dL)
Colesterol total*	< 170	< 170
HDL-C	> 45	> 45
Triglicérides (0-9a) **	< 75	< 85
Triglicérides (10-19a) **	< 90	< 100
LDL-C	< 110	< 110

* CT › 230 mg/dL considerar a probabilidade de hipercolesterolemia familiar.

**Quando os níveis de triglicérides estiverem acima de 440 mg/dL (sem jejum) o médico solicitante fará outra prescrição para a avaliação de TG com jejum de 12h e será considerado um novo exame de triglicérides pelo laboratório clínico.

Fonte: Adaptada do Posicionamento sobre a Flexibilização do Jejum para o Perfil Lipídico. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2017.

Avaliação laboratorial do perfil lipídico

Coleta da amostra

A amostra para a dosagem do perfil lipídico completo pode ser colhida sem jejum, mantendo-se o estado metabólico estável e a dieta habitual do paciente.

No início de 2017, os laboratórios incluíram a flexibilização do tempo de jejum para o perfil lipídico, adequando os seus procedimentos e informando no laudo as diferentes situações de jejum, respeitando a orientação do médico solicitante.

A avaliação do resultado do perfil lipídico pelo médico ocorre de acordo com a indicação do exame, o estado metabólico e a estratificação de risco do paciente.

Os valores referenciais de CT, HDL-C, não HDL-C não se alteram no estado pós-prandial, exceto para os triglicérides. Essa confirmação pode ser observada nas Tabelas 6.3 e 6.4, que mostra os valores referenciais com e sem jejum.

Na coleta de amostra sem jejum os triglicérides sofrem pequenas alterações em indivíduos normais, considerando uma refeição usual sem sobrecarga em gordura, e o valor desejável é inferior a 175 mg/dL. Teremos grandes alterações quando existe comprometimento de alguns órgãos ou há alterações genéticas no metabolismo dos triglicérides.

Nos pacientes em que há retardo no metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicérides, chamadas remanescentes, estas ficam por mais tempo em circulação e são mais aterogênicas, as quais podem ser percebidas a partir dos resultados de TG elevados, representando mais eficazmente seu potencial impacto no risco cardiovascular.

Em situações em que o paciente coletar a amostra sem jejum e estiver com os níveis triglicérides > 440 mg/dL ou em recuperação de hipertrigliceridemia severa, é recomendado ao médico solicitante a prescrição de uma nova avaliação de TG com jejum de 12h e será considerado um novo exame de TG pelo laboratório clínico.

As justificativas para liberar o jejum na determinação do perfil lipídico são várias e a principal é evitar hipoglicemias secundárias ao jejum prolongado em pacientes idosos, diabéticos e crianças.

A coleta de amostra sem jejum para o perfil lipídico viabiliza o acesso dos pacientes ao laboratório, evitando perda de horas de trabalho, abandono de consultas médicas por falta de exames e maior acesso à avaliação do risco cardiovascular.

No documento de Posicionamento foram indicadas as recomendações para o atendimento do paciente no laboratório clínico, o modelo do laudo laboratorial e a dosagem direta ou uso de fórmulas para estimar o LDL-C. Foi sugerida, também, a inclusão de uma observação nos laudos laboratoriais quando encontrados valores de CT ≥ 310 mg/dL (para adultos) ou CT ≥ 230 mg/dL (entre os 2 e os 19 anos), que podem ser indicativos de Hipercolesterolemia Familiar (HF) se excluídas as dislipidemias secundárias.

A principal finalidade do documento integrado das sociedades foi a de padronizar condutas clínicas e laboratoriais, em todo território nacional, para que se obtenha uniformidade no tratamento das dislipidemias, contribuindo para que os médicos e os laboratórios clínicos tenham segurança em suas tomadas de decisões, com o respaldo de evidências científicas.

Fase analítica

A metodologia mais utilizada para a determinação de colesterol total, HDL-colesterol e dos triglicérides é a enzimática colorimétrica. Os diversos kits comerciais disponíveis para a análise de CT e TG apresentam boa correlação e um baixo coeficiente de variação entre eles, permitindo a comparação dos resultados de diferentes laboratórios, em uma mesma amostra. Na dosagem do HDL-C pode-se encontrar variações de até 15% entre os métodos disponíveis. Estes métodos constituem a melhor opção, por apresentarem muito boa sensibilidade e especificidade, simplicidade operacional, baixo custo e possibilidade de automação em laboratórios clínicos.

A avaliação do LDL-C pode ser realizada por método direto ou estimada por fórmulas. A metodologia de dosagem direta do LDL-C por ensaios colorimétricos ainda apresenta grande variação entre os métodos disponíveis no mercado.

Esta variação pode chegar a 30% e não é muito bem entendida na literatura, mas provavelmente isso se deve às diferentes especificidades de cada ensaio, podendo ser fator limitante para a utilização ampla da dosagem direta na prática clínica.

O cálculo do LDL-C pela fórmula de Friedewald é subestimado quando o TG está elevado, e deixa-se de tratar o paciente pela interferência do TG. Na fórmula original se utiliza o fator 5 para dividir o TG que corresponde ao VLDL-C. Na lipoproteína VLDL, à medida que aumenta a concentração de TG reduz o percentual de colesterol e induz a erro no cálculo do VLDL-C.

Um estudo com 1.350.908 crianças, adolescentes e adultos sugere a fórmula de Martin, que utilizou como referência a ultracentrifugação e, por meio de cálculos estatísticos, definiu diferentes divisores para o valor de TG, que permitem estimar com maior fidedignidade os valores de VLDL-C. Para obter estes divisores depende-se da concentração do não HDL-colesterol e da concentração do TG da amostra do paciente (Tabela 6.6). Com este novo divisor (n), aplica-se a fórmula: LDL-C = CT – HDL-C – TG/n, onde n varia de 3,1 a 11,9. Isso significa que podemos calcular o LDL-C com valores de TG na amplitude de 7 mg/dL a 13.975 mg/dL com seus respectivos fatores. A fórmula de Martin traz um benefício importante nas situações em que as limitações da fórmula de Friedewald estão presentes, como a falta de jejum e com valores de TG > 400 mg/

Tabela 6.6 Valores utilizados para o cálculo do VLDL-C e posterior cálculo do LDL-C.

	Não HDL-C (mg/dL)					
Triglicérides (mg/dL)	**< 100**	**100-129**	**130-159**	**160-189**	**190-219**	**> 220**
7-49	3,5	3,4	3,3	3,3	3,2	3,1
50-56	4,0	3,9	3,7	3,6	3,6	3,4
57-61	4,3	4,1	4,0	3,9	3,8	3,6
62-66	4,5	4,3	4,1	4,0	3,9	3,9
67-71	4,7	4,4	4,3	4,2	4,1	3,9
72-75	4,8	4,6	4,4	4,2	4,2	4,1
76-79	4,9	4,6	4,5	4,3	4,3	4,2
80-83	5,0	4,8	4,6	4,4	4,3	4,2
84-87	5,1	4,8	4,6	4,5	4,3	4,3
88-92	5,2	4,9	4,7	4,6	4,4	4,3
93-96	5,3	5,0	4,8	4,7	4,5	4,4
97-100	5,4	5,1	4,8	4,7	4,5	4,3
101-105	5,5	5,2	5,0	4,7	4,6	4,5
106-110	5,6	5,3	5,0	4,8	4,6	4,5
111-115	5,7	5,4	5,1	4,9	4,7	4,5
116-120	5,8	5,5	5,2	5,0	4,8	4,6
121-126	6,0	5,5	5,3	5,0	4,8	4,6
127-132	6,1	5,7	5,3	5,1	4,9	4,7
133-138	6,2	5,8	5,4	5,2	5,0	4,7
139-146	6,3	5,9	5,6	5,3	5,0	4,8
147-154	6,5	6,0	5,7	5,4	5,1	4,8
155-163	6,7	6,2	5,8	5,4	5,2	4,9
164-173	6,8	6,3	5,9	5,5	5,3	5,0
174-185	7,0	6,5	6,0	5,7	5,4	5,1
186-201	7,3	6,7	6,2	5,8	5,5	5,2
202-220	7,6	6,9	6,4	6,0	5,6	5,3
221-247	8,0	7,2	6,6	6,2	5,9	5,4
248-292	8,5	7,6	7,0	6,5	6,1	5,6
293-399	9,5	8,3	7,5	7,0	6,5	5,9
400-13.975	11,9	10,0	8,8	8,1	7,5	6,7

Fonte: Adaptada Martin e colaboradores. JAMA. 2013; 310(19): 2061-681.

dL para estimar o LDL-C, na ausência de reagentes para a dosagem direta.

A inclusão do cálculo do não HDL-C junto aos demais resultados do perfil lipídico para adultos, mesmo sem jejum, é importante pois os níveis de triglicérides não interferem neste cálculo e ele permite a estimação do LDL-C com a fórmula de Martin.

Existem vários artigos na literatura questionando as limitações e a confiabilidade na utilização da fórmula de Friedewald para o cálculo do LDL-C. A mais recente, uma carta ao editor, de especialistas brasileiros, argumenta a necessidade da substituição pela fórmula de Martin para o LDL-C, melhor estimando os níveis de colesterol na lipoproteína LDL no sangue, sem a influência dos níveis de triglicérides.

Deve-se também avaliar a consistência entre as metodologias utilizadas e a existência de certificação do laboratório de análises clínicas que realizou a dosagem. Garantindo-se esses cuidados, se ainda assim persistir a variação além da esperada, o paciente com diagnóstico presuntivo de Dislipidemia deverá ser encaminhado a um serviço especializado para investigação complementar, confirmação diagnóstica, intervenção terapêutica específica e ação de atenção multiprofissional.

Perfil lipídico em Teste Laboratorial Remoto

Os equipamentos disponíveis na plataforma TLR (Teste Laboratorial Remoto) ou POCT (*Point-of-Care Testing*) permitem reduzir o tempo de obtenção do resultado de um analito, oferecendo agilidade e o início precoce do tratamento clínico.

No Brasil, estão disponíveis alguns analisadores de TLR para os lípides, possibilitando a utilização desses exames de acordo com as orientações das diretrizes nacionais. Podem quantificar um lipídio isoladamente, em conjunto com outros analitos ou o perfil lipídico completo. Esses analisadores portáteis possibilitam avaliar o perfil lipídico em uma única tira reagente, utilizando sangue total de punção capilar, e o resultado é obtido em poucos minutos.

Na tira reativa do perfil lipídico são quantificados diretamente o CT, TG e HDL-C; o LDL-C é calculado pela equação de Friedewald, quando o TG < 400 mg/dL. Os valores obtidos permitem estimar o colesterol não HDL e geralmente a coleta é realizada em situação pós-prandial, sendo importante quando o LDL-C não pode ser calculado e porque agrega a avaliação de risco para DVC.

Performance do perfil lipídico em TLR

O desempenho do sistema TRL é considerado aceitável se o coeficiente de variação (CV) estiver nos valores de ± 10% (CT), ± 12% (HDL-C) e ± 15% TG. Embora a metodologia da reação química tenha o mesmo princípio nas tiras reativas, usadas nos diversos equipamentos, é importante seguir as orientações do fabricante quanto ao tipo e à quantidade da amostra.

No sistema POCT, para o perfil lipídico, a amplitude de medição é diferente daquela obtida nos equipamentos de laboratórios, mas é útil para rastrear as alterações dos lípides. Portanto, é indicada uma análise posterior em um laboratório clínico, para o diagnóstico definitivo e o início do tratamento clínico antecipado

Em geral, os dispositivos POCT podem ter maior variabilidade em relação aos equipamentos encontrados nos laboratórios clínicos. Essas diferenças analíticas podem ser devido a uma combinação de variações ambientais como temperatura, umidade, o uso de uma amostra de sangue total e o treinamento de operadores individuais.

Alguns estudos científicos registraram a performance e a validação dos equipamentos POCT para a metodologia de análise do perfil lipídico.

A correlação clínica entre o sistema POCT (Cardio-Chek® PA) e o laboratório clínico de referência do Hospital da Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina (Unifesp/EPM), foi realizada com a coleta simultânea de amostras de sangue venoso e punção digital, em 516 pacientes com jejum de 12h. Ficou confirmado que a performance analítica desse equipamento de TLR é adequada para a utilização em programas de triagem populacional e como atendimento em serviços de saúde, proporcionando resultados rápidos e confiáveis.

Em dislipidemias, o TLR tem demonstrado ser eficaz em triagem populacional, principalmente para identificar um portador da HF e pesquisar seus familiares, prevenindo a formação da aterosclerose precoce e as suas consequências: DCV e AVC (Acidente Vascular Cerebral).

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Quintão E, Nakandakare ER, Passarelli M. Lípides: do metabolismo à aterosclerose. 1ª ed. Sarvier, São Paulo, 2011.
2. Remaley AT, Rifai N, Warnick GR. Lipids, Lipoproteins, and Apolipoproteins. IN: Tietz textbook of clinical chemistry. 5ª ed. Saunders: Philadelphia. 2012; 731-805.
3. Henry JB. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 20ª ed. Barueri, SP: Manole, 2008.
4. Koschinsky ML, Marcovina C. Structure-function relationships is apolipoproteina (a): insights into lipoprotein (a) an assembly and pathogenicity. Curr Opin Lipidol. 2004; 15:167-74.
5. Rohrer L, Hersberger M,Von Eckardstein A. High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. Curr Opin Lipidol. 2004; 15:269-78,.
6. Otokozawa S, Ai M, Diffenderfer MR, Asztalos BF, Tanaka A, Lamon-Fava S, Schaefer EJ. Fasting and postprandial apolipoprotein B-48 levels in healthy, obese, and hyperlipidemic subjects. Metabolism. 2009; 58(11):1536-42.
7. Wang DQ. Regulation of intestinal cholesterol absorption. Annu Rev Physyol. 2007; 69:221-48.
8. Davis HR, Altmann SW. Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. Biochim Biphys Acta. 2009; 1971 (7):679-83.
9. Niot I, Poirier H, Tran TT, Besnard P. Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. Prog Lipid Res. 2009; 48 (2):101-15.
10. Mansbach CM, Siddiqi SA. The biogenesis of chylomicrons. Annu Rev Physiol. 2010; 72:315-33.

11. Raal FJ, Santos RD, Blom DJ, Marais AD, Charng MJ, Cromwell WC, et al. Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet. 2010; 375 (9719):998-1006.
12. Cuchel M, Bloedon LT, Szapary PO, Kolansky DM, Wolfe ML, Sarkis A, et al. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein in familial hypercholesterolemia. N Engl J Medicine. 2007; 356 (2):148-56.
13. Tall AR. CETP inhibitors to increase HDL cholesterol levels. N Engl J Medicine. 2007; 356 (13):1364-6.
14. Brown MS, Goldstein Jl. Receptor mediated control of cholesterol metabolism. Science. 1976; 191:150-7.
15. Lehtonen S, Shah M, Nielsen R, Lino R, Ryan JJ, Zhou H, Farquhar MG. The endocytic adaptor protein ARH associates with motor and centrosomal proteins and is involved in centrosome assembly and cytokinesis. Mol Biol Cell. 2008; 19 (7):2949-61.
16. Goldstein JL, Rawson RB, Borwn MS. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipids synthesis. Arch Biochem Biophys. 2002; 397 (2):139-48.
17. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest. 2002; 109:1125-31.
18. McPherson R, Gauthier A. Molecular regulation of SREBP function: the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis. Biochem Biol. 2004; 82 (1):201-11.
19. Anderson RG, Goldstein J, Brown M. From cholesterol homeostasis to new paradigms in membrane biology. Trends in Cell Biol. 2003; 13 (10):534-9.
20. Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. Trends Biochem Sci 2007; 32(2):71-7.
21. Lambert G, Charlton F, Rye KA, Piper DE. Molecular basis of PCSK9 function. Atherosclerosis. 2009; 203(1):1-7.
22. Grefhorst A, McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptor in mice. J. Lipid Res. 2008; 49 (6):1303-11.
23. Humphries SE, Whittall RA, Hubbart CS, et al. Genetic causes of familial hypercholesterolaemia in patients in the UK: relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk. J. Med. Genet. 2006; 43 (12):943-9.
24. Scartezini M, Hubbart C, Whittall Ra, et al. The PCSK9 gene R46L variant is associated with lower plasma lipid levels and cardiovascular risk in UK healthy men and FH Patients. Clinical Science. 2007; 113, 435 - 41.
25. Humphries SE, Neely RDG, Whittall RA, Troutt JS, Konrad RJ, Scartezini M, Wi KW, Cooper JA, Achayara J, Neils A. Healthy individuals carrying the PCSK9p.R46L variant and Familial Hypercholesterolaemia patients carring PCSK9p.D374Y exhibit lower plasma concentrations of PCSK9. Clin Chem. 2009; 55 (12):2153-61.
26. Careskey HE, Davis RA, Alborn WE, Troutt JS, Cao G, Konrad RJ. Atorvastatin increases human serum levels of proprotein subtilisin/kekin type 9. J Lipid Res. 2008; 49 (2):394-8.
27. Stein EA, Mellis S, Yancopoulos GD, Stahl N, Logan D, Smith WB, Lisbon E, Gutierrez M, Webb C, Wu R, Du Y, Kranz T, Gasparino E, Swergold GD. Effect of a Monoclonal Antibody to PCSK9 on LDL Cholesterol. N Engl J Med. 2012; 366:1108-18.
28. McKenney JM, Koren MJ, Kereiakes DJ, Hanotin C, Ferrand AC, Stein EA. Safety and Efficacy of a Monoclonal Antibody to Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Serine Protease, SAR236553/REGN727, in Patients with Primary Hypercholesterolemia Receiving Ongoing Stable Atorvastatin Therapy. J Am College of Cardiol. 2012; (59):25.
29. Santos RD, Mata P, Stoll M. Hipercolesterolemia Familiar. São Paulo. Conectfarma Publicações Científicas, 2015.
30. Gencer B, Lambert G, Mach F. PCSK9 Inhibitors. Swiss Med Wkly. 2015; 145:w14094.
31. Raal F J, Stein EA, Dufour R, Turner T, Civeira F, Burgess L, Langslet G, Scott R, Olsson AG, Sullivan D, Hovingh GK, Cariou B, Gouni-Berthold I, Somaratne R, Bridges I, Scott R, Wasserman SM, Gaudet D. RUTHERFORD-2 Investigators. PCSK9 inhibition with evolocumab (AMG 145) in heterozygous familial hypercholesterolaemia (RUTHERFORD-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet. 2015; 385:331- 40.
32. James L, Batty J, Neely RD, Kunadian V. PCSK9 inhibitors in the prevention of cardiovascular disease. J Thromb Thrombolysis Apr 19. [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/s11239-016-1364-1, 2016.
33. Benn M, Watts GF, Tybjaerg-Hansen A, et al. Familial hypercholesterolemia in the Danish general population: prevalence, coronary artery disease, and cholesterol-lowering medication. J Clin Endocrinol Metab. 2012; 97 (11):3956-64.
34. Sjouke B, Kusters DM, et al. Homozygous autosomal dominant hypercholesterolaemia in the Netherlands: prevalence, genotype-phenotype relationship, and clinical outcome. Eur Heart J. 2015; 36 (9):560-5.
35. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2013; 101 (1):1-22.
36. III Diretrizes Brasileiras em Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2001; (77): suplemento III.
37. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2007; (88): Suplemento I,.
38. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: Consensus Statement of the European Atherosclerosis Society. European Heart Journal. 2013; 34 (45):3478-90.
39. Howdieshell TR, Bhalla N, DiPiro JT, Kuske T, Baisden R. Effects of free glycerol contained in intravenous fat emulsion on plasma triglyceride determination. JPEN - J Parenter Enteral Nutr. 1995; 19 (2):125-6.
40. Goussault Y, Turpin E, Neel D, Dreux C, Chanu B, Bakir R, Rouffy J. Pseudohypertriglyceridemia caused by hyperglycerolemia due to congenital enzyme deficiency. Clin Chim Acta. 1982; 123 (3):269-74.
41. Warnick GR, Myers GL, Cooper GR, Rifai N. Impact of the third cholesterol report from the adult treatment panel of the national cholesterol education program on the clinical laboratory. Clin Chem. 2002; 48 (1):11-17.
42. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972; 18:499-502.
43. Langsted A, Freiberg JJ, Nordestgaard BG. Fasting and nonfasting lipid levels: influence of normal food intake on lipids, li-

poproteins, apolipoproteins, and cardiovascular risk prediction. Circulation 2008; 118: 2047-56.
44. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, et al. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. JAMA 2007; 298:299-308.
45. Langsted A, Nordestgaard BG. Nonfasting Lipids Profiles: The way of the future. Clinical Chemistry. 2015; 61 (9):1123-25.
46. Price CP, StJohn A. Point-of-care testing. IN: Burtis CA; Ashwood ER; Bruns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis. 5 ed. Saunders: Philadelphia, 2011; (20):487-505.
47. Diretriz para Gestão e Garantia da Qualidade de Testes Laboratoriais Remotos (TLR) da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (SBPC/ML), 2ª ed. Barueri, SP: Minha Editora. 2016; 534.
48. Nichols JH. Risk management for point-of-care testing. J Int Fed Clin Chem. 2014; 25: 24-25.
49. Matteucci E, Della Bartola L, Rossi L, Pellegrini G, Giampietro O. Improving CardioCheck PA analytical performance: three-year study. Clin Chem Lab Med. 2014; 52:1291-6.
50. Ferreira CES, França CN, Correr CJ, et al. Clinical correlation between a point-of-care testing system and laboratory automation for lipid profile. Clin Chim Acta 2015; 446: 263-6.
51. Faludi AA, Izar MC, Saraiva JF, Chacra AP, Bianco HT, Afiúne A, et al. Coloque 2017 e não 2016 . Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose - 2017**.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2017 (em publicação).
52. Scartezini M, Ferreira CES, Izar MC, Bertoluci M et al. Posicionamento sobre a Flexibilização do Jejum para o Perfil Lipídico. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2017; 108 (3):195-7.
53. Ferreira CES, Scartezini M, França, CN. Letter to the Editor: Lipid profile, the world needs to change. Journal of Clinical Lipidology, 2017 (in press).
55. Martin SS, Blaha MJ, Elshazly MB, Toth PP, Kwiterovich PO, Blumenthal
56. RS, et al. Comparison of a novel method vs the Friedewald equation for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels from the standard lipid profile. JAMA. 2013; 310(19): 2061-681.

7

capítulo

Alceu de Oliveira Toledo Júnior

Doenças Cardiovasculares

INTRODUÇÃO

A doença cardiovascular decorrente de causas isquêmicas tem como principal causa a existência e progressão da aterosclerose, definida como doença crônico-evolutiva, com característica difusa, porém segmentar e excêntrica, apresentando-se com componentes proinflamatórios e protrombóticos, e importantes interações celulares do componente arterial, quer sejam de endotélio, macrófagos, plaquetas, músculo liso ou linfócitos.

Há elementos multifatoriais envolvidos nos mecanismos aterogênicos, tais como: dislipidemia (principalmente), hipertensão arterial, sedentarismo, tabagismo, obesidade, *Diabetes mellitus* e estilo de vida, porém as alterações no metabolismo lipídico são etapa inicial do processo de formação da placa aterosclerótica, principalmente a passagem pela camada endotelial de lipoproteínas aterogênicas, alterações plasmáticas tais como: elevação do LDL-c, redução do HDL-c, maior permanência/concentração dos remanescentes de quilomícrons no período pós-prandial, elevação dos triglicérides, aumento de frações de VLDL-c pequenas ou mesmo as elevações da Lp(a).

A presença de um estado pró-inflamatório e vasoconstritor, criando situação de estresse hemodinâmico, e a dislipidemia pró-aterogênica podem promover a ocorrência de eventos isquêmicos agudos ou intercorrentes nos ramos arteriais coronarianos, que em função da sua intensidade, locais atingidos, cronologia isquêmica, inexistência de malha coronariana colateral bem desenvolvida e condições clínicas preexistentes podem levar a eventos extensos, com altos custos financeiros, importantes consequências hemodinâmicas e intenso impacto na vida dos indivíduos, alterando não só o seu tempo, mas a sua qualidade, comprometendo sua estabilidade ou mesmo interrompendo-a.

A Síndrome Coronariana Aguda (SCA), em função da sua manifestação, pode ser dividida em duas categorias: SCA Sem Supradesnivelamento do Segmento ST (SCA-SST) e SCA Com Supra-desnivelamento do Segmento ST (SCA-CST), considerando-se a manifestação eletrocardiográfica e a substituição do termo Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) pela forma mais ampla, porém de maior receptividade, aqui descrita como SCA.

Uma importante diferença deve ser aqui estabelecida, onde as SCA-CST têm como característica uma oclusão arterial prolongada e/ou persistente com tempo ≥ 30 minutos, com dano isquêmico seguido por necrose do cardiomiócito e surgimento subsequente, mas futuro, de uma alteração eletrocardiográfica denominada onda Q, a qual torna-se reveladora do acontecimento anteriormente descrito e cuja presença, mesmo durante eventos cardioisquêmicos agudos posteriores, indica acontecimento(s) cardio-necrótico(s) prévio(s). Já as SCA-SST melhor definem-se pela oclusão parcial e/ou transitória, gerando uma alteração momentânea entre aporte e consumo de oxigênio pelo cardiomiócito, com tempo de sua ocorrência < 30 minutos, mas sem dano necrótico imediato.

Independentemente da natureza das lesões nas SCA, o evento inicial está fortemente vinculado à placa aterosclerótica, quer na lesão erosiva quer na ruptura da capa fibrosa. Esta, por sua vez, corresponde a aproximadamente 67% das tromboses coronarianas fatais, enquanto aquela contribui com aproximadamente 33% dos eventos. A participação do sistema hemostático (referencial ou protrombótico) está vinculada à geração de trombo plaqueta-dependente (trombo "macio"), o qual possui indicação ao uso de antiagregantes plaquetários ou fibrinogênio-dependente (trombo "duro"), este por sua vez com indicação ao uso de trombolíticos.

A participação do componente lipídico nesse processo é lenta, porém contínua, iniciando o processo pela infiltração das LDL-c, e também das VLDL-c pequenas, quer inicialmente pela transcitose, microcitose ou com o avançar das lesões ateroscleróticas por mecanismos que envolvem as fenestrações endoteliais, com a formação progressiva das etapas envolvidas na aterosclerose, quer da estria lipídica inicial, a formação da capa fibrosa ou da lesão mais extensa e complicada, que terá como elemento diferencial maior ou menor espessura da placa fibrolipídica, que conferirá à placa em questão a condição de estável (placa "fria") ou instável (placa "quente"), essa última com maior intensidade na sua atividade metabólica e maiores riscos de rompimento, com

consequente exposição de seu mais volumoso conteúdo lipídico-celular na luz do vaso atingido.

Os fatores que desencadeiam o rompimento da placa, apesar de bem definidos e conhecidos, nem sempre são estabelecidos como relação causa-efeito imediata nas SCA, principalmente nas SCA-CST. Nesse aspecto, a avaliação clínico-laboratorial deve ser realizada com fins discriminatórios e investigativos. Como exemplo, a determinação de Colesterol Total dentro de um período máximo de 24 horas após o evento, pois dela decorre uma melhor abordagem e conduta clínica-evolutiva aplicadas ao indivíduo.

MARCADORES LABORATORIAIS NAS SÍNDROMES CORONÁRIAS AGUDAS

Aspectos históricos

A definição do dano ao cardiomiócito, quer na forma de isquemia ou necrose, requer do laboratório uma participação ágil, resoluta e com importante consistência técnica. Nesse aspecto deve-se fornecer resultados que melhor expressem a realidade biológica do paciente, inclusas suas variáveis pré e pós-analíticas. Lembre-se de que a frase "músculo é tempo" aqui tem sua melhor forma de uso. O grande desafio que o laboratório enfrenta na abordagem cardiológica emergencial é estabelecer diferenças confiáveis e rápidas, mas sempre fundamentadas em evidências claras e bem-estabelecidas.

Desta forma, a utilização de analitos, tais como: LDH Total ou suas isoenzimas, AST, CK Total, com fins de diagnóstico de inclusão e/ou exclusão ou mesmo monitoramento não mais se utiliza, tanto pela baixa sensibilidade clínica quanto pelo fato de não serem tecido-dependente de forma única, nas musculaturas lisa, esquelética ou cardíaca.

Mesmo a determinação de CK-MB na forma Atividade ou mesmo Massa apresenta-se com limitações (a primeira com maiores), sendo mesmo considerada obsoleta quando comparada à análise de Troponinas Cardíacas (cTnI ou cTnT), elementos com menor cardiossensibilidade, elevações frequentes em situações não cardíacas, baixa relação com a progressão aguda do processo e presença de formas circulantes anômalas (nem sempre detectáveis pelo laboratório) seriam aspectos desfavoráveis à sua utilização. Entretanto, deve-se considerar aspectos que envolvam a indisponibilidade local da determinação de cTnI ou cTnT, assim a determinação da CK-MB Massa nessa situação seria uma opção secundária, pois comparativamente às cTn sua capacidade de exclusão/inclusão diagnósticas são menores ao avaliarem-se estados de injúria ao cardiomiócito e seus desdobramentos clínicos. Nas situações de reinfarto o uso de CK-MB, defendido por alguns, apresenta-se com menor consistência quando comparado ao uso de cTn, importante aspecto diz respeito que a interpretação dos resultados obtidos por Troponinas requer um protocolo muito bem-estabelecido entre o laboratório e a cardiologia.

A Mioglobina, apesar da sensibilidade clínica, apresenta limitações pela sua baixa cardioespecificidade, impossibilitando a correta avaliação da origem no processo de dano muscular, mesmo porque mínimas alterações na permeabilidade do miócito da musculatura esquelética promovem sua liberação na circulação, além disso, como sofre eliminação via renal, redução na Filtração Glomerular promove a sua elevação plasmática, tornando seu uso limitado no diagnóstico cardiológico. A Figura 7.1 resume as possíveis relações decorrentes da injúria gerada ao cardiomiócito.

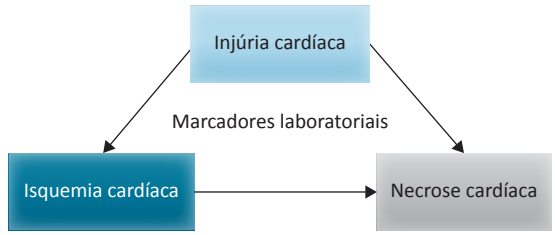


Figura 7.1 Injúria gerada ao cardiomiócito e possíveis relações. A isquemia, em função de sua cronologia, intensidade/extensão, pode promover morte do cardiomiócito. Os marcadores laboratoriais não definem a natureza imediata do dano, mas são indispensáveis na definição dos estados isquêmicos agudos, principalmente nas SCA-SST.

Fonte: Acervo do autor.

Troponinas

O aparato contrátil da estrutura muscular possui em sua composição proteínas regulatórias. As troponinas são um complexo formado por três subunidades proteicas: Troponina C (ligante ao cálcio), Troponina I (componente inibitório), e Troponina T (componente tropomiosina ligante), havendo presença de subunidades em suas isoformas, as quais são distribuídas em tecidos musculares cardíaco, esquelético e liso, porém o tecido cardíaco possui somente as isoformas I e T, motivo pelo qual a Troponina C não teve seu uso vinculado aos processos diagnósticos de natureza cardíaca.

A especificidade das isoformas cardíacas é claramente definida por serem produtos de genes únicos, motivo pelo qual a denominação de Troponinas Cardíacas (descritas como cTnI e cTnT), sua localização é na miofibrila (95%) e em pequena concentração citoplasmática (5%), essa última localização mesmo em pequenos valores é vista como forma de mobilização rápida nos processos de injúria cardioespecíficos. A cTnI difere de sua isoforma esquelética por uma sequência de 31 aminoácidos, sendo sua presença exclusiva do tecido cardíaco, não existindo nem mesmo em tecidos normais, de regeneração, ou em miopatias esqueléticas, a cTnT difere de sua isoforma esquelética por uma sequência de 11 aminoácidos, sendo também cardioespecífica, porém há descrição da expressão de isoformas da cTnT em tecido muscular esquelético em situações que envolvem distrofia, polimiosite, dermatomiosite e doença renal crônica, razão pela qual a escolha do fabricante/plataforma/anticorpo usado em ensaios laboratoriais deve levar em conta tais aspectos, evitando-se sobreposição de valores entre as Isoformas cardíacas e a Isoformas com reexpressão.

Há fortes evidências de que, em situações de dano miocárdico ou até mesmo de predisposição genética, haveria a liberação tissular e a presença no plasma de cTn em formas biológicas diferentes das encontradas em situações referenciais. Essas formas poderiam ser descritas como: complexos binários (cTnIC e cTnTC), complexos ternários (cTnTIC), formas livres (I), e, ainda, eventuais modificações (pela permanência aumentada das cTn no plasma), que promovam alterações tais como: oxidação, desfosforilação, redução ou fosforilação, pois mesmo nessas formas as cTn apresentariam valor laboratorial discriminatório nos processos cardíacos. Essas informações são importantes ao analisarmos os ensaios utilizados na mensuração das cTn, sendo determinante que os mesmos devem possuir anticorpos que reconheçam adequadamente todas as frações anteriormente descritas, e que demonstrem uma resposta equimolar em todas as formas circulantes das cTn.

Avaliação laboratorial das troponinas

O uso das cTn requer um processo de padronização e também de cumprimento de normas e especificações por parte dos fabricantes, tanto na fase analítica quanto na pré-analítica, e aqui alguns são descritos: uso de epítopos na parte estável da molécula, adequada resposta frente a diferentes formas circulantes, comutabilidade de diferentes ensaios, capacidade em promover a diferenciação das formas circulantes, uso de anticoagulantes e suas implicações, rastreabilidade dos calibradores, análise crítica da faixa dinâmica da metodologia e definição de valores referenciais.

Nesse aspecto, a definição de valor referencial esbarra em algumas importantes informações vinculadas à metodologia empregada, plataforma dos equipamentos e seus fabricantes, porém é necessária uma criteriosa análise por parte do laboratório na escolha do que melhor se adapte às suas necessidades: técnica, operacional, e mesmo de custo financeiro. Exemplo disso é a escolha por métodos de determinação de cTn vinculados às orientações de consensos internacionais como "Global Task Force for The Universal Definition of Myocardical Infartaction", "National Academy of Clinical Biochemistry" (NACB) e atualizações do "*American College of Cardiology/American Heart Association*".

O uso de Troponinas, principalmente na atual modalidade dos ensaios de 4ª e 5ª gerações, designado Troponinas de Alta Sensibilidade (hs-cTnI e hs-cTnT), requer vinculação obrigatória a um Coeficiente de Variação (CV) máximo de 10% no percentil 99, esse por sua vez diz respeito a um valor referencial máximo, definido como Limite de Decisão (LD), onde incluem-se dentro de sua faixa 99% das pessoas referenciais, que não apresentariam alteração metabólico-funcional do cardiomiócito, sendo portanto compreendido como valor discriminatório na avaliação da injúria cardíaca. Há, ainda, a definição de Valor Mínimo Detectável (VMD − sensibilidade analítica) e o espaço estatístico existente entre este e o percentil 99 (faixa dinâmica da metodologia). Dentro desse espaço, os diferentes fabricantes têm suas plataformas/metodologias classificadas e estratificadas em: Diretrizes Aceitáveis, Clinicamente útil ou Não Aceitável, com graduações em níveis entre 1 e 4, em que, respectivamente, se tem:

a) Nível 4 com detecção ≥ 95% entre o VMD e o percentil 99.
b) Nível 3 com detecção ≥ 75% até 94% entre o VMD e o percentil 99.
c) Nível 2 com detecção ≥ 50% até 74% entre o VMD e o percentil 99.
d) Nível 1 com detecção ≥ 25% até 49% entre o VMD e o percentil 99.

Tal descrição entre níveis 4 e 3 representa melhores desempenhos de plataformas/metodologias vinculadas a hs-cTnI e hs-cTnT, sendo um importante elemento diferencial na escolha das mesmas em nossas rotinas laboratoriais, portanto seu uso é recomendado e sua análise merece o esforço do laboratório para implantação pelos melhores resultados a serem obtidos. Outro aspecto crítico na escolha e no uso por parte do laboratório é a definição do LD, vinculado ao percentil 99, ao LMD, e à variação no percentil 99, pois esses elementos, por serem fabricante/plataforma/metodologia dependentes, apresentam-se com ampla margem de variação , com algumas importantes diferenças, abaixo descritas:

a) LMD - Fabricante "A" 0,90 ng/L - Fabricante "B" 9 ng/L.
b) Percentil 99 - Fabricante "A" 10 ng/L - Fabricante "B" 16 ng/L.
c) CV no Percentil 99 - Fabricante "A" 9% - Fabricante "B" 5%.

A análise de tais informações deve considerar a forma de uso das hs-cTnI e hs-cTnT pelo laboratório, e seu desdobramento em processos de inclusão/exclusão diagnósticas, monitoramento, público-alvo no atendimento, natureza dos serviços (emergência, UTI, ambulatório), definição associada aos serviços de cardiologia clínica e cirúrgica, bem como os desdobramentos técnico-financeiros de tais escolhas. A definição, ainda do percentil 99, deve ser muito bem-delimitada, pois o número de participantes envolvidos na constituição do grupo/estudo, idade, sexo e completa exclusão de cardiopatias (mesmo crônicas) que devem ter sido corretamente tratadas pelo fabricante em sua formulação estatística e ter sua descrição disponível ao laboratório (em um claro formato), para que se possa fazer a melhor opção vinculada à escolha fabricante/plataforma/metodologia a ser utilizada. Há importante elemento associado à possibilidade de separação do percentil 99 escalonado por elementos tais como: idade até 30 anos; idade maior que 30 anos, sendo que nesse último grupo a melhor opção seria haver média de idade entre 55 e 65 anos; e, finalmente, que o grupo populacional do estudo fosse composto por 300 a 500 participantes.

A determinação analítica da hs-cTn deve seguir com rigor os protocolos pré-analíticos definidos pelo fabricante, quer em formas de coleta, natureza das amostras: plasma (escolha do anticoagulante) ou soro (com ou sem sistema de

aceleração/separação de fases), estocagem, estabilidade térmica, bem como na fase analítica, no uso de sistemas de calibração, controles ou fases de trabalho, pois isso representa fator crítico na avaliação do resultado fornecido pelo laboratório.

Interpretação

Há descrição de alguns meios de melhoria na avaliação dos resultados das hs-cTn com o uso de duas determinações, em dois períodos de tempo distintos. Entre a primeira determinação e a segunda deve decorrer um intervalo máximo de 3 horas, com oscilações superiores a 20% entre a primeira e a segunda, sendo compatíveis com dano do cardiomiócito, desde que todas elas acima do percentil 99. Tal protocolo permitiria uma melhor avaliação dos valores obtidos, separando-os e analisando-os sob o enfoque do percentil 99 e do LD, e com isso melhorando a especificidade clínica, mas não necessariamente a sensibilidade clínica nos eventos de injúria cardíaca. Aliás, nesse aspecto, o uso das troponinas não avalia a natureza do dano, ou seja, não determina sua etiologia, porém consegue determinar sua existência. A cTn é liberada do aparelho contrátil em situações de injúria no cardiomiócito por meio da degradação proteolítica, e nessa situação os valores encontrados são maiores que o percentil 99.

Mas há cTn livre no citoplasma, assim o encontro de valores de cTn inferiores ao Limite de Decisão deve também ser associado à apoptose, ao *turnover* do cardiomiócito, à elevação da permeabilidade celular ou à mínima degradação proteica, com possibilidade de haver situações de injúria reversível. Nesses casos, associando-se a situação clínica envolvida, seria necessária a determinação de uma segunda amostra. As diferentes formas de injúria, em suas intensidades, graus de reparação e frequência teriam maior importância clínica. Exemplo disso é o fato de valores acima do LD, desvinculados de sintomas clínicos imediatos, estarem associados a maior incidência de danos cardíacos futuros. O maior problema nesse caso residiria, então, na injúria ao cardiomiócito de forma repetitiva.

Porém, a dificuldade está em definir com segurança a diferença entre dano reversível e dano irreversível, isso de maneira precoce, assim, a elevação da cTn em eventos não isquêmicos do cardiomiócito têm prognóstico adverso em quase todas as situações. Comparativamente, entre três grupos, mostra-se que a mortalidade média é de 1,5% no grupo com valores de cTn até o LMD; passa a 4% no grupo com valores de cTn, entre o LMD e o percentil 99; e chega a 6% no grupo com valores de cTn superiores ao percentil 99.

Os valores obtidos pelo laboratório devem ser submetidos a análise, sempre vinculada à condição clínica. Nesse aspecto, valem algumas considerações: os valores discriminatórios de 20% são propostos pelo uso dos "delta" da hs-cTn em que, pela natureza da determinação das hs-cTn apresentar-se com Limite de Decisão, há importantes dificuldades na avaliação da Variabilidade Biológica (CVb). Não haveria possibilidade de avaliação das diferentes formas de hs-cTn, assim as duas determinações para obtenção do "delta" da Troponina sempre devem ser feitas sob os mesmos protocolos de fabricante/plataforma/metodologia, então não poderíamos analisar e comparar determinações realizadas entre hs-cTnI e hs-cTnT, ou mesmo entre hs-cTn e cTn por método convencional.

A escolha dos períodos de tempo poderia ser realizada também entre 3 e 6 horas e 0 e 6 horas; a escolha do tempo 0-3 horas indica ser a opção mais resoluta no processo discriminatório, com melhor valor de exclusão diagnóstica, mas apesar disso a sua indicação como elemento diagnóstico de inclusão é mais bem estabelecida na presença de SCA-SST; o uso da hs-cTn teria então poder de inclusão médio de 91%, contra valor médio de exclusão de 96%. Nos momentos da avaliação imediata ao paciente com suspeita de SCA teríamos médias de incidência de SCA-SST em 70% e SCA-CST em 30%, o que reforça a participação do laboratório como elemento diferencial no diagnóstico. O uso de hs-cTn desde que inclusas nas Diretrizes Aceitáveis – níveis 3 e 4, e critérios experientes na análise e interpretação do(s) resultado(s) reduziria a incidência de resultados "falso-positivos" existentes na metodologia convencional.

A Figura 7.2 esquematiza os aspectos clínico-laboratoriais envolvidos na interpretação dos resultados das troponinas cardíacas ultrassensíveis (ensaios de 5ª geração).

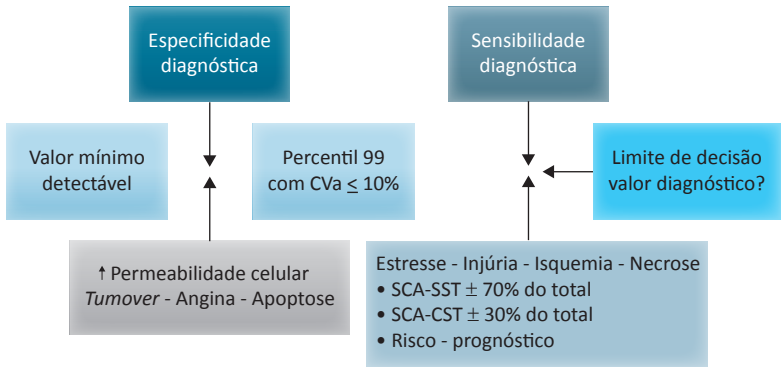


Figura 7.2 Aspectos laboratoriais e clínicos envolvidos na interpretação dos resultados das hs-cTn – ensaios de 5ª geração. A definição dos protocolos de abordagem aos aspectos técnicos da metodologia e aos valores obtidos é crítica para a conduta mais adequada.
Fonte: Acervo do autor.

A determinação no período entre 3 e 6 horas possibilitou o diagnóstico de SCA em 25% dos pacientes submetidos a essa análise de valores. Além disso, 51% apresentaram valores de hs-cTnT pelo menos superior ao percentil 99, mas sem a elevação de 20% (uso do "delta"). Nesse grupo em especial foi caracterizado o diagnóstico de Angina Instável. Tal fato surpreende, pois não deveria haver elevação das hs-cTnT nessa situação, considerando-se que, apesar da maior estratificação de pacientes com o uso do "delta", ainda são necessários estudos mais amplos para o uso rotineiro de tal protocolo. O uso da hs-cTn teria maior habilidade em discriminar injúria cardíaca, que ainda não alterou valores na cTn em metodologias convencionais, sendo possivelmente um limitador importante no uso de exames de maior poder de visualização das lesões, tais como a angiotomografia, e para isso a avaliação laboratorial das hs-cTn deveria sofrer melhor padronização, inclusive nas unidades usadas como expressão dos valores obtidos, preferencialmente no formato ng/L ao invés dos atuais μg/L. Exemplo disso seriam, respectivamente, 0,009 μg/L convertidos em 9 ng/L, tornando mais simples a leitura e a interpretação numérica dos resultados.

Há no âmbito laboratorial diferentes formatos na avaliação qualitativa convencional das cTnI, onde a presença de "testes rápidos" simultaneamente possibilitou o acesso a esse novo marcador cardíaco aos laboratórios que até então não tinham disponível tal determinação, mas também criou algumas situações em que a falta de "padronização" nos resultados obtidos, as dificuldades na obtenção de controles e/ou calibradores rastreáveis, o desconhecimento da sensibilidade analítica em uso, valores de referência com baixo valor de exclusão, a dificuldade de estabelecer a existência ou não de anticorpos voltados à parte estável da molécula da cTnI e a falta de comutabilidade entre esses ensaios e uma correta descrição de LD criou algumas dificuldades na seleção, na estratificação e nas condutas clínicas decorrentes dos resultados obtidos por esses testes.

Torna-se indispensável ao definir a implantação de metodologias dessa natureza, inclusive em Testes Laboratoriais Remotos (TLRs) levando-se em conta a importância da situação clínica e os desdobramentos dos resultados fornecidos, estabelecer protocolos, sistema de validação e formas de interpretação de valores (principalmente qualitativos), que atendam de forma coerente a essas necessidades. Quando se analisa a hs-cTn em pacientes com Insuficiência Cardíaca Congestiva na forma descompensada há forte associação entre valores elevados e maior mortalidade, principalmente sob hospitalização, mesmo onde não houve SCA. Há algumas situações nas quais mesmo na elevação das cTn não se tem injúria cardíaca isquêmica, tais como: ICC nas formas agudas e crônicas, Tromboembolismo Pulmonar (TEP), vasoespasmo coronariano, intervenções coronarianas percutâneas, rabdomiólise com injúria do cardiomiócito.

MARCADORES LABORATORIAIS NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CRÔNICA

Os fatores natriuréticos cardíacos são peptídios e seus fragmentos, todos produzidos no cardiomiócito, tanto nos tecidos atriais como ventriculares, sob diferentes situações e em resposta a variações dos volumes de enchimento das câmaras cardíacas, sobrecarga e/ou expansões volêmicas sistêmicas. Tais moléculas estão associadas a situações que envolvem a Insuficiência Cardíaca (IC), essa considerada uma das fases finais das cardiopatias, e na qual há incapacidade de bombeamento do fluxo sanguíneo necessário ao atendimento da demanda do metabolismo. Há normalmente comprometimento da função contrátil ventricular, com disfunção sistólica classificada em graus I a IV, tendo as SCA Isquêmicas importante participação na etiologia desses processos.

Peptídeos natriuréticos cardíacos plasmáticos

Os peptídeos natriuréticos são pequenas moléculas formadas por segmentos terminais e uma parte central, respectivamente com um total de 108 aminoácidos, onde a extremidade aminoterminal é composta por uma sequência de 27 aminoácidos, a extremidade carboxila terminal por 32 aminoácidos e a parte central com 49 aminoácidos, apesar da sua aparente simplicidade estrutural, sua produção, liberação e atividade ainda não estão totalmente elucidadas.

A extremidade NH2-terminal não possui atividade biológica definida, sendo descrita como NT-proBNP, estando fixada por meio da junção 21 a 27 à região central da molécula que, por sua vez, possui 49 aminoácidos e é considerada a região regulatória do processo de maturação bioquímica da molécula total produzida pelo cardiomiócito. Tal ponto da regulagem metabólica é realizado pela ligação da glicose a essa mesma parte central, em um processo de estabilização/maturação como resposta compensatória e altera os mecanismos da endoclivagem com uma ação enzimática envolvida na posição 74 a 76 (resíduo da treonina), denominada "glicosilação" (os termos glicação e glicosilação não são sinônimos), sendo essa a fase limitante do "amadurecimento" da molécula completa do ProBNP.

A região entre os aminoácidos 74 a 76, por sua vez, liga-se à extremidade carboxila terminal, a qual possui 32 aminoácidos, sendo essa região a responsável pela importante atividade biológica vinculada às ações natriuréticas exercidas por esse peptídio. Assim sendo, o ProBNP possui o segmento NT-proBNP e o segmento BNP. Apesar de ambos terem relação equimolar aparente, seus valores referenciais e tempos de meia-vida são diferentes, indicando que mesmo uma aparente simplicidade estrutural da molécula ProBNP requer melhores estudos na elucidação de sua produção, fases da expressão gênica pós-translacional, mecanismos de ativação pré e pós-clivagem, e ações biológicas.

Há diferenças nos fenótipos expressos na produção do ProBNP, atrial ou ventricular, onde a produção atrial é dominante em situações cardíacas referenciais, e a produção ventricular dominante na vigência de doenças cardíacas, isso poderia ser associado à ideia de que a produção nos cardiomiócitos ventriculares regulasse a expressão gênica tanto transcripcional como translacional do gene ProBNP.

Avaliação laboratorial peptídios natriuréticos cardíacos plasmáticos

O uso de maior expressão tanto do NT-proBNP quanto do BNP é na avaliação da disfunção ventricular (consequência ou não das SCA), quer na situação diagnóstica (inclusão ou exclusão), quer no monitoramento, sendo uma excelente ferramenta no prognóstico das alterações ventriculares. A determinação laboratorial nas duas situações é realizada por sistemas de imunoensaios, dirigidos contra diferentes epítopos moleculares havendo, pelo formato estrutural, maior reatividade cruzada nas determinações de NT-proBNP do que na determinação de BNP (pela presença da porção NH2 terminal), porém ambos são passíveis de interferências mediadas por anticorpos heterófilos (fator reumatoide, por exemplo), adicionalmente à determinação tanto do NT-proBNP quanto do BNP parece avaliar conjuntamente a extensão da molécula (ProBNP), razão pela qual é indispensável a análise técnica pelo laboratório das informações do fabricante/plataforma/metodologia utilizadas para melhor definir essas situações.

As amostras a serem utilizadas devem seguir de forma rigorosa a descrição proposta pela metodologia empregada, pois há diferenças estruturais nos ensaios e nos seus formatos, por exemplo, amostras para análise do BNP devem ser plasma (EDTA-K3 em tubos plásticos) e amostras para NT-proBNP devem ser obtidas como Soro ou Heparina-Na (em tubos plásticos ou de vidro). Além disso, a variação Analítica (CVa) deve ser inferior a 15%, devendo haver descrição clara de eventual reatividade cruzada com outros peptídios natriuréticos tais como NT-proANP, ANP, CNP, pois esses últimos, apesar de elevar os resultados obtidos, não são representativos do ponto de vista biológico ou clínico (promovendo falsas elevações), tanto o NT-proBNP quanto o BNP teriam, desde que respeitadas as informações anteriormente descritas, a mesma forma de aplicação, uso ou interpretação, mesmo considerando-se que a primeira faz parte da forma biológica inativa da molécula, e a segunda da forma ativa, ou até pelo fato de possuírem diferentes Valores Referenciais (VRS) ou LD. Nesses aspectos cabe a descrição de que o seu uso deva ser mantido, ou seja, não se deve "intercalar" ensaios de NT-proBNP e BNP para o mesmo indivíduo, quer sob condução diagnóstica, quer de monitoramento.

NT-proBNP e BNP têm grande variabilidade biológica intra-individual (CVb), respectivamente e de forma aproximada como 50% e 33%, o que deve ser ponderado, principalmente na interpretação de resultados vinculados ao monitoramento da Disfunção Ventricular, pois nesses casos as variações entre dois resultados laboratoriais (de um mesmo analito) teriam impacto clínico (tanto de evolução quanto de regressão do quadro), somente com oscilações em torno de 80% (quanto comparados entre si). Portanto, valores que se apresentarem inferiores a tais oscilações deveriam ser analisados de forma referencial. Há situações de elevação dos valores do NT-proBNP e BNP que abrangem: ascite, miocardite, insuficiência renal (aguda e crônica), hipertrofia ventricular esquerda, hipertensão pulmonar, hiperaldosteronismo e doença de Cushing.

Interpretação

Considerando-se isso, os VRs seriam estabelecidos LD, nos quais a abordagem clínica, sua interpretação e os resultados laboratoriais estariam também associados às informações do CVb, exclusão de outras patologias e mesmo a delimitação da idade. Teríamos, pois, valores para o BNP em 100 pg/mL e para o NT-proBNP em 125 pg/mL, porém mesmo assim há 26% da população que apresenta valores de BNP > que 100 pg/mL (100 a 500), um terço dos quais não possui Disfunção Ventricular (DV) e/ou Insuficiência Cardíaca Congestiva (ICC), e os outros dois terços com alterações cardíacas. Nesse último grupo, porém, com LD variáveis, mesmo o uso do NT-proBNP teria seus LD adaptáveis para exclusão da ICC em < que 300 pg/mL, mas ainda haveria o problema da influência do aspecto idade. Aqui, então, poderíamos melhor definir essa situação descrevendo como LD "adaptáveis" no seguinte formato: quando < que 450 pg/mL (para pessoas com idade até 50 anos) e < que 900 pg/mL (para pessoas com idade > que 50 anos) seriam excludentes da ICC. Mesmo com essas considerações há, contudo, limitações na conduta clínica, limitadas aos resultados laboratoriais obtidos, pois as elevações numéricas, mesmo com o uso específico dos LD, ainda são restritivas por fatores tais como: fabricante/plataforma/metodologia, e não conseguem ainda com o uso desses marcadores definir com alta resolução as implicações de seus resultados.

Essas informações devem ser bem-estabelecidas, em seu formato clínico ou laboratorial, para que NT-proBNP ou BNP possam ser adequadamente interpretados em seu melhor formato e extensão. Assim, o uso desses marcadores não teria indicação no rastreio de pacientes com DV, mas teria seu uso associado a pacientes sob alto risco de seu desenvolvimento. Tal conceituação deve ser ampliada no aspecto clínico ao utilizarmos tais marcadores. O uso, principalmente do BNP como avaliação vinculada às cTn, nas SCA-SST teria valor nas situações em que haja importante associação de fatores tais como: obesidade, hipertensão, idade, histórico familiar ou gravidade do quadro na apresentação emergencial do evento. Mesmo assim, os resultado(s) obtido(s) devem ser criteriosa e tecnicamente avaliados, porque muitos dos estudos conduzidos assim o foram, pelo uso de cTn em fabricante/plataforma/metodologia sem o formato hs-cTn, portanto com baixa forma de padronização, no LMD ou LD, embora haja proposição para que nesses casos o LD do BNP fosse > que 80 pg/mL, sendo importante a realização de melhores estudos nesse sentido.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Agewall S, Giannitsis E, Jernberg T, Katus H. Troponin elevation in coronary vs. non-coronary disease. Eur Heart J 2011; 32:404-11.
2. Bassand JP, Hamm CW, Ardissino D, Boersma E, Budaj A, Fernández-Avilés F, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. Eur Heart J 2007; 28:1.598-660.

3. Berger R, Huelsman M, Strecker K, Bojic A, Moser P, Stanck B, et al. B-type natriuretic peptide predicts sudden death in pacients with chronic heart failure. Circulation 2001; 105:2.392-7.
4. Bonaca M, Scirica B, Sabatine M, Dalby A, Spinar J, Murphy SA, et al. Prospective evaluation of the prognostic implications of improved assay performance with a sensitive assay for cardiac troponin I. J Am Coll Cardiol 2010; 55:2.118-24.
5. Bodor GS, Survant L, Voss EM, Smith S, Porterfield D, Apple FS. Cardiac troponin T composition in normal and regenerating human skeletal muscle. Clin Chem 1997; 43:476-84.
6. Burtis CA, Ashwood ER (ED). Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnosis. 5a ed. Philadelphia: Saunders, 2012 .
7. Christoffersen C, Goetze JP, Bartels ED, Larsen MO, Ribel U, Rehfeld JF, et al. Chamber-dependent expression of brain natriuretic peptide and its mRNA in normal and diabetic pig heart. Hypertension 2002; 40:54-60.
8. Jaffe AS. Comparative sensitivity of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for diagnosing acute myocardial infarction. Clin Chem 1996; 42:1.770-6.
9. Kavsak PA, Ko DT, Wang X, Macrae AR, Jaffe AS. Increasing cardiac troponin changes measured by a research high-sensitivity troponin I assay. Absolute vs percentages changes and long-term outcomes in a chest pain cohort. Clin Chem 2010; 56:1902-4.
10. Korosoglou G, Mueller D, Lehrke S, Steen H, Hosch W, Heye T, et al. Quantitative assessment of stenosis severity and atherosclerotic plaque composition using 256-slice computed tomography. Eur Radiol 2010; 20:1.841-50.
11. Ladenson JH. A personal history of markers of myocyte injury [myocardial infarction]. Clin Chim Acta 2007; 381:3-8.
12. Lellouche N, De Diego C, Cesario DA, Vaseghi M, Horowitz BN, Mahajan A, et al. Usefulness of preimplantation B-type natriuretic peptide level for predicting response to cardiac resyncronization therapy. Am J Cardiol 2007; 99:242.
13 Lindahl B, Venge P, James S. The new high-sensitivity cardiac troponin T assay improves risk assessment in acute coronary syndromes. Am Heart J 2010; 160:224-9.
14. Mueller M, Biener M, Vafaie M, Doerr S, Keller T, Blankenberg S, et al. Absolute and relative kinetic changes of high-sensitivity cardiac troponin T in acute coronary syndrome and in patients with increased troponin in the absence of acute coronary syndrome. Clin Chem 2012; 58:209-18.
15. Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, Newby LK, Ravkilde J, Storrow AB, et al. National Academy of Clinical Biochemistry practice guidelines: clinical characteristics and utilization of biomarkers in acute coronary syndromes. Clin Chem 2007; 53:552-74.
16. Mundy BJ, McCord J, Nowak RM. B type natriuretic peptide levels are inversely related to body mass index in patients with heart failure. J Am Coll Cardiol 2003; 41(suppl):158A.
17. Ooi DS, Isotalo PA, Veinot JP. Correlation of antemortem serum creatine kinase, creatine kinase MB, troponin I anda troponin T with cardiac pathology. Clin Chem 2000; 46:338-44.
18. Panteghini M, Gerhardt W, Apple FS, Dati F, Ravkilde J, Wu AH. Quality especifications of cardiac troponins assays. Cin Chem Lab Med 2001; 39:175-9.
19. Peacok WF, De Marco T, Fonarow GC, Diercks D, Wynne J, Apple JS, et al. Cardiac troponis and outcome in acute heart failure. N Engl J Med 2001; 39:175-9.
20. Ricchiuti V, Apple FS. RNA expression of cardiac troponin T isoforms in disease human skeletal muscle. Clin Chem 1999; 45:2.129-35.
21. Rosalki SB, Roberts R, Katus HA, Giannitsis E, Ladenson JH, Apple FS. Cardiac biomarkers for detection of myocardial infarction: perspectives from past to present. Clin Chem 2004; 50:2.205-13.
22. Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, Jarolim P, Braunwald E. Detection of acute changes in circulating troponin in the setting of transient stress test-induced myocardial ischemia using an ultrasensitive assay: results from TIMI 35. Eur Heart J 2009; 30:162-9.
23. Tamm NN, Seferian KR, Semenov AG, Mukharyamova KS, Koshkina EV, Krasnoselsky MI, et al. Novel imunoassay for quantification of brain natriuretic and its precursor in human blood. Clin Chem 2008; 54:1.511-8.

8

capítulo

Marcos José Machado

Pâncreas

INTRODUÇÃO

O pâncreas é uma das maiores glândulas do corpo humano, responsável pela secreção de várias substâncias fundamentais para a digestão e homeostase interna dos nutrientes energéticos. Está localizado transversalmente no espaço retroperitoneal próximo à 2ª e 3ª vértebras lombares. Estende-se entre a porção inicial do intestino delgado, o duodeno, e o hilo do baço. No adulto apresenta peso entre 70 e 100 gramas, ou em média 95 gramas no homem e 85 gramas na mulher, medindo cerca de 20 centímetros. Anatomicamente é dividido em cabeça (alojada na alça do duodeno), colo, corpo e cauda, que se estendem em direção ao baço. A perfusão arterial é realizada pelos ramos da aorta abdominal, e a drenagem do sangue venoso ocorre para a veia porta a partir das veias pancreáticas.

O pâncreas é revestido por uma camada fina de tecido conjuntivo, a partir do qual se propagam os septos para dividir o órgão em vários lóbulos. Estendem-se pelos septos interlobulares a maioria dos vasos linfáticos, juntamente com os vasos sanguíneos, nervos e ductos para excreção das secreções. Intrincada rede anastomosada de arteríolas e vênulas além de pequenos vasos linfáticos são encontrados, verificada nos lóbulos pancreáticos. Os ductos de excreção das secreções iniciam-se nos lóbulos como pequenos canais. Sua união proporciona a organização de um sistema de ductos com calibres internos cada vez maiores até formarem ductos pancreáticos principal e acessório.

Embora já conhecido desde a Antiguidade, sua primeira descrição é atribuída ao grego *Herophilus* de *Chalcedon* (300 a.C.), e sua denominação *Pankreas*, definida por *Ruphos* de *Ephesus* no seu trabalho sobre o nome das partes do corpo humano. Literalmente, pâncreas é *todo* [constituído] *de carne*, a partir do grego *pan* [todo] e *kreas* [carne]. Entretanto, sua denominação não está relacionada a um órgão no todo igual, e, sim, à observação em cadáveres por *Ruphos* de ausência de osso ou cartilagem.

Na realidade, organizado em lóbulos, o pâncreas é constituído basicamente em duas diferentes porções funcionais. A porção conhecida como pâncreas exócrino tem a função de produzir a secreção necessária à digestão dos alimentos, e a porção endócrina, cuja função primordial é a manutenção da homeostase corpórea da glicose, produzindo e secretando hormônios. Histologicamente, a porção endócrina é representada por um aglomerado de células diferenciadas, com formato ovalado, localizadas na porção mais central do lóbulo pancreático, as *Ilhotas de Langerhans.* Ao redor das ilhotas são encontrados muitos conjuntos de células com características bem-definidas e organizadas em estruturas ligeiramente esféricas ou alongadas com um lúmen central, os ácinos pancreáticos. Ainda nos lóbulos são verificadas as células pancreáticas estreladas (miofibroblastos) responsáveis pela manutenção da matriz extracelular, contendo proteínas fibrosas (como colágeno e elastina), glicoproteínas e proteoglicanos.

Pâncreas exócrino

A porção exócrina constitui de 80% a 90% da massa do pâncreas. As células do pâncreas exócrino são responsáveis pela síntese, armazenagem e secreção das enzimas digestivas. Elas são conhecidas como células acinares e apresentam formato poligonal, com membrana polarizada em dois domínios principais, um lado maior em uma das extremidades (membrana basilar), e outro menor (membrana apical) com cerca de 10% da superfície total da membrana citoplasmática. O núcleo é central, com localização mais para a região basilar. O citoplasma contém grande quantidade de organelas, destacando-se o sistema reticular endotelial rugoso e aparelho de Golgi, além das mitocôndrias, representando grande capacidade de síntese proteica. O ápice da célula contém grânulos de armazenamento das diferentes proteínas digestivas, os grânulos de zimogênios.

A estrutura pancreática *ácino* [do latim = bago de fruto de cachos] é unidade funcional do pâncreas exócrino. Um ácino constitui-se de várias células acinares, dispostas radialmente, originando uma estrutura arredondada semelhante à porção de um cacho de uvas. Cada ácino pode apresentar de 20 a 50 células em média, e sua estrutura pode ser ovalada ou cilíndrica. No seu interior ocorre um espaço, um lúmen circundado pelas células.

As células delimitantes do lúmen acinar são achatadas e denominadas centroacinares. Elas revestem o canal iniciado no ácino, que constituem a primeira parte do sistema de

ductos pancreáticos, os ductos intracelulares, os quais continuarão com a denominação de intercalados. Os lóbulos pancreáticos apresentam diversos ácinos, os quais são interligados por pequenos ductos intralobulares. Esses canais continuam ampliando seu calibre e unindo-se a outros, provenientes de outros lóbulos, originando a rede de ductos extralobulares (ou interlobulares). O sistema de ductos assim formado é responsável pela drenagem do conteúdo dos zimogênios para os ductos maiores, de Wirsung e Santorini, e posteriormente para o duodeno. O ducto principal une-se ao ducto biliar em um canal comum, a ampola *Vater*. É através da papila de *Vater,* envolta pelo esfíncter de *Oddi,* que a secreção pancreática alcança o duodeno. O ducto de *Santorini* drena as secreções pancreáticas em uma papila localizada acima daquela de *Vater.*

As células acinares sintetizam enzimas digestivas normalmente na forma de uma proteína inativa (uma proenzima ou zimogênio). As enzimas sintetizadas são capazes de promover a decomposição de macromoléculas em suas unidades fundamentais, permitindo assim a absorção desses nutrientes (Tabela 8.1). Há principalmente três maiores categorias de enzimas

Tabela 8.1 Características de proteínas pancreáticas.

Enzima/proteína (proenzima)	Peso molecular (dáltons)	Substrato	Ação
Tripsina (Tripsinogênio)	25.000-23.000	Proteínas	Clivagem de ligações peptídicas entre resíduos de lisina ou arginina com outros resíduos de aminoácidos das cadeias polipeptídicas
Quimiotripsina (Quimiotripsinogênio)	24.000-23.500	Proteínas	Clivagem de ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina, fenilalanina) preferencialmente, além de leucina com outros resíduos de aminoácidos das cadeias polipeptídicas
Carboxipeptidase (Procarboxipeptidase)	27.000-35.500	Proteínas	Clivagem de ligações peptídicas dos resíduos de aminoácidos carboxiterminais das cadeias polipeptídicas
Elastase (Proelastase)	33.000-26.600	Proteínas	Clivagem de ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos com cadeias laterais alifáticas com outros resíduos de aminoácidos das cadeias polipeptídicas. Tem efetiva atividade sobre as proteínas estruturais (elastina) do tecido conjuntivo incluindo vasos sanguíneos
Calicreína (Procalicreína)	48.000	Proteínas	Ativação de cininas (mediador de inflamação), contudo sua função fisiológica no suco pancreático é desconhecida
Amilase	55.000-60.000	Carboidratos (Amido, Amilopectina e Amilose, glicogênio)	Clivagem de ligações glicosídicas $\alpha 1 \rightarrow 4$ entre resíduos de glicose
Lipase	46.000-56.000	Lipídios neutros (gorduras neutras) – Triacilglicerois	Clivagem de ligações de ésteres do glicerol com ácidos graxos de cadeia longa (principalmente). Apenas ligações nos carbonos 1 e 3 do glicerol são clivadas; a enzima atua somente com o substrato emulsionado
Colipase (Procolipase)	10.000	Cofator da Lipase	Interage com a lipase, induzindo mudança conformacional de forma a facilitar a catálise promovida pela enzima (na prática fixa a enzima na interface da micela facilitando a exposição do sítio catalítico da lipase)
Colesterol esterase (carboxil-éster-hidrolase	100.000	Lipídios diversos (ésteres de colesterol e outros ésteres).	Clivagem de ligações ésteres de lipídios
Fosfolipase A	14.000	Fosfolipídios	Clivagem de ligações ésteres de fosfolipídios
Ribonuclease e Desoxirribonucleases	15.000 -30.000	Ácidos nucleicos	Clivagem de ácidos nucleicos (RNA e DNA)

Fonte: Dufour DR, 2010; Hall JE, 2011; Hall JE, 2011; Henderson AR; *et al*., 1986; Hruban RH; *et al*., 2010; McNeely MDD; *et al*., 1989; McNeely MDD; *et al*., 1989; Moss DW; *et al*., 1986; Van Lente F., 1997.

digestivas: as amilases, lipases e proteases, as quais promovem a hidrólise de carboidratos, gorduras neutras e proteínas, respectivamente. As células epiteliais dos ductos são as responsáveis pela secreção de bicarbonato e água, facilitando o escoamento da secreção pancreática. Proteínas não digestivas como inibidores de protease, o inibidor do tripsinogênio (o inibidor da serina protease Kazal do tipo 1. SPINK1) e o cofator colipase são também produzidos e liberados na secreção.

Após sua armazenagem nos grânulos próximos às membranas apicais, as enzimas são liberadas por exocitose, graças a mecanismos hormonais e neurológicos coordenados. A ingesta de alimentos induz a síntese das enzimas pancreáticas por estimulação vagal direta do órgão via acetilcolina. Com a entrada do quimo (alimentos processados no estômago) no duodeno inicia-se a fase intestinal, com grande quantidade de suco sendo drenado para o duodeno. Dois hormônios intestinais têm participação fundamental nesta produção: a secretina e a colecistocinina. O primeiro induz a liberação de água e bicarbonato nos ductos menores, e o segundo provoca grande liberação das enzimas e proenzimas existentes nos grânulos apicais das células acinares.

O fluido pancreático assim secretado consiste em liquido incolor alcalino contendo água, proteínas digestivas e eletrólitos. Cerca de 1 a 3 litros de fluido pancreático podem ser secretados ao dia. A concentração das enzimas amilase e lipase é cerca de 10 mil vezes aquela verificada no plasma, e a de bicarbonato cinco vezes a plasmática. As proenzimas tripsinogênio 1 e 2 são as proteínas em maiores concentrações, representando cerca de 20% do total de proteínas secretadas. Os principais cátions verificados são: sódio, potássio, cálcio e magnésio, e entre os ânions destacam-se o cloreto e o bicarbonato.

Pâncreas endócrino

A porção endócrina constitui de 2% a 5% da massa do pâncreas. As células do pâncreas endócrino estão organizadas em torno de 1 milhão de ilhotas de Langerhans dispersas por todo o pâncreas. Em uma ilhota podem existir até 4 mil células, com quatro tipos principais de células secretoras. As células α secretoras do hormônio glucagon constituem cerca de 20% a 30% da ilhota; já as células β são a maioria, 60% a 80%, e produzem a insulina. As outras duas células são a δ e célula PP (célula F), representando 2% a 10% e 1% a 2% respectivamente das unidades funcionais do pâncreas endócrino. As células δ sintetizam e liberam o hormônio somatostatina, já as células PP, o polipeptídio pancreático.

A origem embrionária dessas células é a mesma verificada pelas células acinares e dos ductos pancreáticos As ilhotas estão em contato direto com as células acinares, que as rodeiam e recebem cerca de 10% do fluxo sanguíneo pancreático. Uma anastomosada rede de capilares e arteríolas supre diretamente as ilhotas, e geralmente irrigam também as células acinares. Esse fluxo sanguíneo favorece a influência dos hormônios secretados pelas células das ilhotas sobre o pâncreas exócrino e vice-versa, bem como uma eficiente distribuição sistêmica desses hormônios via sistema porta.

A função do pâncreas endócrino está em promover a regulação normal do metabolismo da glicose através da adequada síntese e liberação dos hormônios insulina e glucagon. A insulina é a responsável pela captação rápida, pelo armazenamento e pela utilização da glicose por quase todos os tecidos do organismo, com ênfase nos músculos, no fígado e no tecido adiposo. Sua liberação ocorre logo após a ingesta e absorção de glicose. O glucagon faz com que os níveis sanguíneos de glicose sejam mantidos, ao estimular a glicogenólise e gliconeogênese hepática. Ele também disponibiliza ácidos graxos como fontes de energia ao estimular a lipólise do tecido adiposo por ativação da lipase das células adiposas.

DOENÇAS DO PÂNCREAS

Pancreatites

As inflamações do pâncreas são enfermidades relativamente comuns. O processo inflamatório ocorre normalmente na porção exócrina, comprometendo sua funcionalidade. A sintomatologia pode ser branda ou grave, variando entre uma enfermidade autolimitada até um processo sistêmico com risco de vida.

No Brasil, segundo dados do Datasus, de janeiro de 2008 até agosto de 2016 houve 220.729 internações por esta enfermidade, e os óbitos verificados representaram 5,7% (12.553 óbitos) destas. A Figura 8.1 apresenta as taxas de mortalidade (óbitos por 100 mil habitantes) nos vários estados brasileiros para as pancreatites. Na Figura 8.2 as internações verificadas por faixa etária e sexo podem ser observadas.

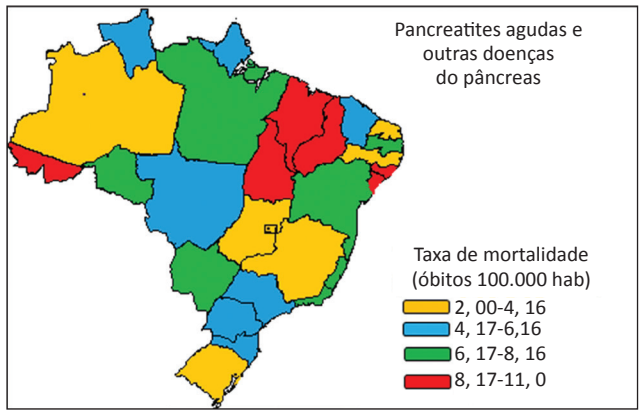


Figura 8.1 Taxa de mortalidade por pancreatite aguda e outras doenças do pâncreas nos diversos estados brasileiros entre janeiro de 2008 e maio de 2016.

Fonte: BRASIL. Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) TABNET/ DATASUS. Brasília, 2016.

Pancreatite aguda

É uma inflamação no pâncreas capaz de gerar uma resposta inflamatória sistêmica, de alta morbidade e relativa mortalidade. A lesão no parênquima pancreático pode ser

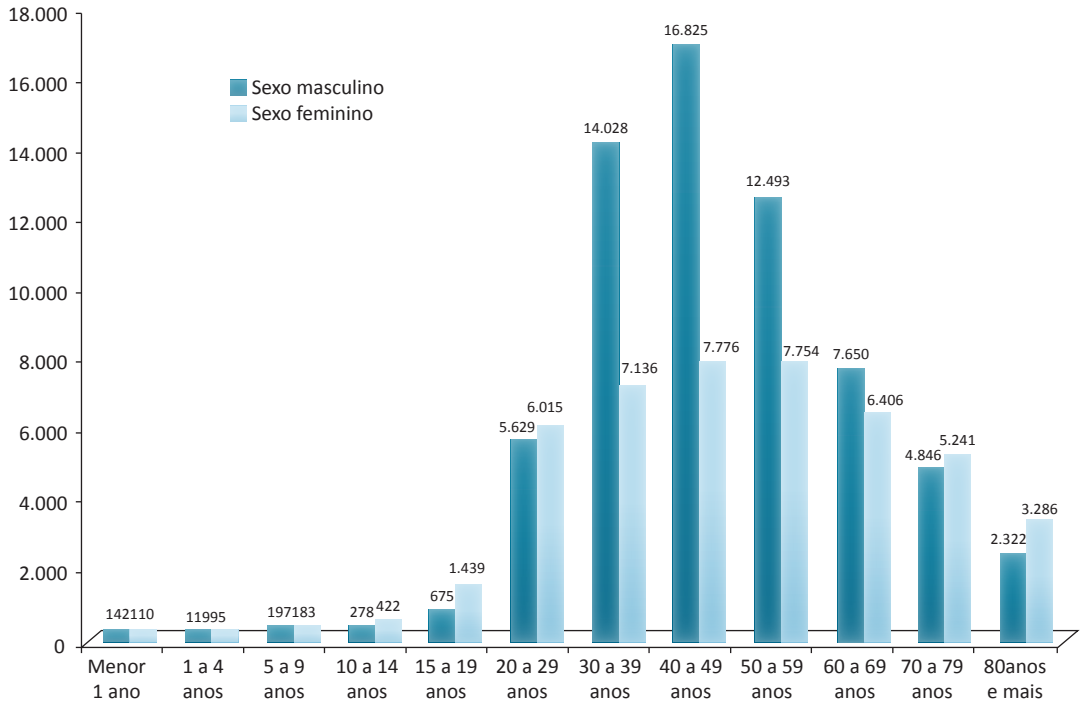


Figura 8.2 Internações por pancreatite aguda e outras doenças do pâncreas no Brasil entre janeiro de 2008 e maio de 2016, por faixa etária e sexo.

Fonte: Ministério da Saúde – Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS).

revertida. Dentre suas causas etiológicas mais comuns são encontradas as colelitíases e o etilismo. A primeira é a causa mais prevalente entre as mulheres, e a segunda entre os homens. Em estudo com pacientes de um hospital de Porto Alegre a proporção de 58% das mulheres com a doença foi maior comparativamente aos homens. A causa biliar foi observada na maioria dos casos, 61% deles.

Também são agentes etiológicos hipertrigliceridemia, hipercalcemia, medicamentos e drogas, lesões isquêmicas (choque, trombose vascular, vasculite), traumas pancreáticos, lesões associadas a cirurgias ou ao exame colangiopancreatografia endoscópica retrógrada (CRPE), mutações genéticas no gene do tripsinogênio-1 que o torna imune à inativação pela própria tripsina (PRSS1), mutações no gene do inibidor da tripsina (SPINK1), infecções bacterianas ou virais, além da presença de obstrução nos ductos pancreáticos decorrente de massas tumorais ou por parasitas e outros elementos.

A forma de apresentação clínica pode ser branda (leve, intersticial) ou severa (grave, necrosante), respectivamente, a resolução pode ser rápida, aproximadamente uma semana, ou prolongada, durando semanas ou meses, com manifestações sistêmicas ou locais, que podem ser curadas, levar à morte ou deixar sequelas. A dor abdominal aguda persistente e intensa é um sintoma comum, geralmente referida para a região superior das costas. Náuseas, vômitos e perda do apetite a acompanham, a febre não é frequente, mas pode ocorrer devido à resposta inflamatória.

É uma emergência médica, com suas manifestações decorrentes dos mediadores inflamatórios e substâncias do fluido pancreático liberadas na circulação. Dependendo da severidade pode ocorrer leucocitose, hemólise, coagulação intravascular disseminada, retenção de fluidos, ascite, necrose gordurosa, infecções por bactérias intestinais no sítio necrótico, choque decorrente do comprometimento vascular e necrose tubular aguda. A morte ocorre em torno de 5% dos indivíduos por choque na primeira semana da doença, embora a síndrome da angústia respiratória aguda (Sara, comprometimento pulmonar decorrente de lesão na membrana capilar alveolar) e insuficiência renal aguda também possam ser complicações sérias.

É fundamental avaliar a gravidade da pancreatite aguda no momento de seu diagnóstico. O emprego de escores clínico-laboratoriais tem sido desenvolvido e seu uso recomendado por consenso internacional. Eles levam em consideração diferentes condições clínicas e laboratoriais dos pacientes, como idade, oxigenação sanguínea, parâmetros hematológicos e bioquímicos entre outros. Três sistemas são os mais usados: o de Ranson, o Apache II (*Acute Physiology and chronic health evaluation*), e o de Glasgow. A tomografia computadorizada é fundamental no diagnóstico da necrose pancreática. A proteína C-reativa, o peptídio de ativação do tripsinogênio-1 (TAP) e o tripsinogênio-2 urinário têm sido avaliados como marcadores bioquímicos associados a maior gravidade da pancreatite aguda.

O processo patológico observado na pancreatite aguda evidencia um processo de autodigestão tecidual no pâncreas, decorrente da ativação inapropriada das enzimas constituintes de sua secreção digestiva normal. A tripsina pode ativar todas as proenzimas presentes nos grânulos de zimogênio, como a proelastase e a profosfolipase que, ativas, atuam sobre a elastina dos vasos sanguíneos e fosfolipídios de membrana dos adipócitos. A calicreína ativa o sistema de complemento e o sistema de coagulação favorecendo a inflamação, como trombose e rompimento de pequenos vasos. A ativação dessas enzimas do suco pode ocorrer devido à obstrução dos ductos, tripsinogênio em quantidade superior ao seu inibidor pode ser retido, desencadeando um desequilíbrio, o qual resultaria na ativação das proenzimas. A lipase represada e ativa poderia levar à necrose gordurosa local, induzindo as células estelares a se diferenciarem em miofibroblastos e liberarem juntamente com o tecido necrosado e leucócitos cininas proinflamatórias. Outro mecanismo seria a destruição direta da célula acinar desencadeada por vírus, fármacos, isquemia e mesmo traumas. E um terceiro seria o comprometimento na exocitose e/ou na formação dos grânulos de armazenamento.

Evidências têm se acumulado sobre um papel central do acúmulo de cálcio intracelular na patogênese da pancreatite aguda. A manutenção de concentração elevada desse íon promove, inicialmente, comprometimento dos mecanismos de defesa celular acarretando ativação de tripsinogênio intracelular. Lisossomos e grânulos de zimogênios são lesados no interior das células acinares. Ocorre necrose dessas células, com derrame de proteases ativadas no espaço intersticial, atingindo outras células vizinhas. Ativa-se um ciclo de necrose celular em cascata, a qual resulta em comprometimento do parênquima pancreático, promovendo uma inflamação e edema local. Dependendo da extensão da lesão atingida, uma resposta inflamatória sistêmica pode ser gerada. A lesão pancreática pode apresentar-se como uma leve inflamação com edema até uma severa e extensa necrose com hemorragia.

Pancreatite crônica

Caso haja perda permanente de função exócrina do pâncreas, a pancreatite será definida como crônica. Ocorre destruição irreversível do tecido pancreático exócrino, com fibrose e possível destruição de tecido endócrino em longo prazo. Normalmente, o doente apresentava episódios recorrentes de pancreatite aguda e, tempos mais tarde, em geral, anos, surge insuficiência pancreática progressiva tanto na porção endócrina quanto na exócrina e calcificação nos ductos.

Um sintoma comum aos pacientes é a dor, além de cálculos nos ductos pancreáticos com obstruções. Também no canal biliar pode ocorrer obstrução, além de estenose duodenal e hipertensão portal com varizes e risco de câncer pancreático. O etilismo é uma das principais etiologias, mas hiperparatireoidismo, hipertrigliceridemia, pancreatite tropical, obstrução de ducto pancreático por tumor, pâncreas *divisum*, doenças autoimunes e de origem genética também são fatores causais.

Uma das causas mais comuns no Brasil é o abuso de álcool. Estudo em Goiânia-GO mostrou ser o principal fator etiológico em 89% dos casos; já em São Paulo-SP esteve presente em 93,6% e 93,4% dos casos.

Câncer pancreático

O tumor pancreático mais comum é do tipo adenocarcinoma, afetando principalmente a cabeça do órgão. Devido à sua difícil detecção, ele apresenta alta mortalidade. O câncer inicia-se no epitélio dos ductos, evoluindo de lesões pré-malignas até um câncer altamente invasivo. De forma menos comum, tumores específicos das diferentes células das ilhotas de *Langerhans* podem ocorrer. Geralmente sua maior característica é a hiperprodução hormonal. São exemplos os insulinomas (células β) e os glucagonomas (células α).

Fibrose cística

É uma doença genética de caráter autossômico recessivo de grande frequência. No Brasil sua incidência estimada está em torno 1 para 10 mil nascidos vivos. Consiste de um comprometimento no transporte iônico transmembranar de células epiteliais, resultando em secreções alteradas das glândulas exócrinas e células de revestimento intestinal, pulmonar e reprodutivo. A secreção com alta viscosidade pode obstruir ductos de drenagem e ocasionar manifestações clínicas, como insuficiência pancreática, pancreatites e *Diabetes mellitus*.

A causa é a deficiência na proteína reguladora da condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) devido a mutações genéticas. Nos pacientes com fibrose cística clássica o suor apresenta concentração elevada de cloreto de sódio (suor salgado), além de deficiência na secreção de bicarbonato no suco pancreático e secreção pulmonar e intestinal com pouca água. Mutações no gene CFRT estão associadas com maior propensão à pancreatite.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS DOENÇAS DO PÂNCREAS

O diagnóstico laboratorial das enfermidades pancreáticas tem sua maior aplicação na avaliação de pancreatites. Os testes são geralmente no sentido de avaliar a função exócrina diretamente ou testes indiretos para avaliar lesão nas células pancreáticas. Os testes indiretos têm sua fundamentação na determinação de enzimas encontradas nos fluidos biológicos, após o evento agudo, enquanto os de avaliação de função em diferentes tipos de testes.

A avaliação da insuficiência pancreática pode ser realizada com a mensuração de atividade de enzimas e concentração de eletrólitos no suco pancreático, após estimulação com secretina. A avaliação prognóstica do câncer pancreático tem sido realizada também pela mensuração do marcador tumoral CA 19-9. A verificação qualitativa ou quantitativa de gorduras nas fezes, assim como a presença de atividade enzimática de tripsina e quimiotripsina e elastase nesse material ou, ainda, detecção de metabólitos (excretados na urina ou

no ar expirado) provenientes da atividade de quimiotripsina a partir da ingesta de substratos especiais são também usados na avaliação de insuficiência pancreática.

Amilase

A enzima amilase (AMS, E.C. 3.2.1.1, α-1,4-glucano-4--glucanohidrolase) catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo α-1,4 em polissacarídeos. Esta enzima degrada moléculas de amido, amilopectina, amilose e glicogênio em componentes menores. O resultado da catálise enzimática sobre o polissacarídeo é a formação de dextranas, maltose e moléculas de glicose.

A amilase é encontrada nas glândulas salivares e no pâncreas. A enzima necessita íons cloretos e cálcio para atividade ótima como cofatores, sendo o pH ideal de 6,9 a 7,0. Tem peso molecular entre 55 e 60 mil dáltons, sendo assim livremente filtrada nos glomérulos, podendo ser detectada na urina.

São encontradas no soro duas diferentes isoenzimas: a tipo-S, de origem salivar, e a tipo-P, pancreática. São conhecidas pelo menos seis isoformas para essas duas isoenzimas, as quais têm diferentes migrações eletroforéticas e podem ser separadas por diferentes métodos. Baseados em diferentes princípios, que empregam diferentes substratos, existem muitos métodos para análise de amilase. Os métodos podem ser classificados em três grupos distintos, conforme as diferentes técnicas para detecção do produto formado, técnicas, amiloclásticas, sacarogênicas e cromogênicas.

As primeiras utilizam o amido como substrato, e a atividade é medida pela sua hidrólise, com detecção dos produtos do amido por turbidimetria, nefelometria ou através da complexação com iodo (iodométricas). Nas técnicas sacarogênicas os monossacarídeos e/ou dissacarídeos liberados são medidos na avaliação da atividade enzimática. Empregam-se várias formas para a detecção dos produtos formados, como reações enzimáticas acopladas para a detecção de glicose. As técnicas mais comumente utilizadas atualmente são as cromogênicas, por serem rápidas, com excelente precisão, e de fácil execução. Nestas o substrato é um polissacarídeo ou oligossacarídeo (com glicoses unidas através de ligações glicosídicas) acoplado a um corante. Ao agir sobre o carboidrato complexo, a amilase libera o corante e sua atividade pode ser determinada pela variação colorimétrica observada.

A determinação de amilase é realizada geralmente no soro, entretanto concentrações na urina − líquidos ascítico, peritoneal e pleural − podem ser determinadas com a maioria das técnicas de dosagem. Os líquidos podem ser empregados para a avaliação de derrame da enzima para os mesmos. Exceto heparina, os demais anticoagulantes podem quelar cálcio, inibindo a atividade da enzima em até 15%, assim somente plasma heparinizado pode ser empregado para análise. A atividade da enzima é estável por quatro dias em temperatura ambiente, duas semanas a 4 °C, um ano a -25 °C e até cinco anos a -75 °C.

A principal utilidade da medida de amilase total ou isoenzimas pancreáticas é auxiliar no diagnóstico de pancreatites agudas. No soro desses pacientes, a enzima tipicamente eleva-se dentro de 2 a 12 horas do aparecimento dos sintomas, alcançando um pico em 24 horas (normalmente acima de cinco vezes o limite superior de referência), permanecendo em níveis elevados por três a sete dias. Na urina de pacientes com pancreatites agudas os níveis de amilase total também se encontram elevados e podem permanecer assim por até dez dias. As medidas de amilase total apresentam menor especificidade diagnóstica, pois elevações séricas são verificas em apendicites, doenças renais, cetoacidose diabética, gravidez ectópica e muitas outras enfermidades não pancreáticas. A isoenzima P é valiosa na diferenciação de pacientes com pancreatites de outras enfermidades, contudo devido a dificuldades técnicas geralmente não é empregada.

Lipase

A principal fonte da enzima lipase (LPS; E.C. 3.1.13; a triacilglicerol acil-hidrolase) é o pâncreas. Armazenadas nos grânulos das células acinares, 99% dessas enzimas são liberadas no sistema de ductos e chegam ao duodeno para exercer sua ação hidrolítica sobre as gorduras neutras. Apenas 1% pode alcançar a circulação sistêmica via vasos linfáticos e capilares pancreáticos. A diferença de concentração entre o plasma e este órgão para esta enzima é de 20 mil vezes. Outras fontes de lipase são: duodeno, fígado, pulmão, leite humano, tecido adiposo e leucócitos, entre outros.

A concentração plasmática da enzima eleva-se geralmente entre 4 e 8 horas após o surgimento dos sintomas de pancreatite, alcançando picos em torno de 24 horas e permanecendo elevada por até 8 a 14 dias. A meia-vida plasmática desta enzima é de 6,9 a 13,7 horas e superior àquela da amilase, permanecendo sua atividade aumentada por mais tempo do que a da amilase.

Essa hidrolase é uma serina-protease, apresentando em seu sitio catalítico resíduos dos aminoácidos, acido aspártico, histidina e serina. Ela apresenta um sítio de reconhecimento do substrato hidrofóbico e seu cofator proteico colipase é fundamental para a interação com esse substrato. Existe em duas formas moleculares nas células acinares pancreáticas e no soro de indivíduos saudáveis. Nos casos de pancreatites é possível observar até quatro bandas eletroforéticas. Ela apresenta peso molecular entre 46 mil a 56 mil dáltons. Seu pH ótimo é de 7,5 a 10,0, e modulada por cálcio e sais biliares.

Os ensaios para lipase são rápidos e de baixo custo, podendo ser comparáveis aos de amilase. Entretanto, a fração geralmente observada no soro é de origem pancreática, o que acarreta maior especificidade ao ensaio. Os ensaios apresentam para a pancreatite aguda sensibilidades diagnósticas variando de 53% a 100%, e especificidades entre 85% a 99%. Maior especificidade e sensibilidade são observadas ao utilizar-se como pontos de corte valores superiores a três vezes o limite superior de referência (LSR). No Brasil, sensibilidade de 92% a 76% e especificidade de 77% a 94% foram observa-

das no diagnóstico de pancreatite aguda, variando os pontos de corte entre o limite superior de referência e cinco vezes este valor. Os melhores índices diagnósticos foram encontrados com um limite de duas vezes o LSR, tanto para a lipase quanto para a amilase.

O pâncreas é a maior fonte de lipase plasmática e, assim, sua acurácia diagnóstica é superior à determinação de atividade da amilase plasmática total. Sua sensibilidade diagnóstica é maior na avaliação de pancreatites ocasionadas pelo abuso da ingestão de álcool. Relação entre lipase e amilase superior a 3 foi observada em pacientes de hospital público de Uberlândia, que apresentavam pancreatite aguda de causa alcoólica. Em pacientes com doença de causa biliar esta relação foi menor.

A determinação da atividade de lipase pode ser realizada por diferentes metodologias. Métodos titulométricos permitem a medida da velocidade da reação enzimática, através da medida do ácido graxo liberado por ação da lipase. Métodos colorimétricos permitem a detecção dos ácidos graxos por reações de mudanças cromáticas verificada em indicador vermelho de metila presente no sistema de reação. Ensaios imunométricos podem envolver aglutinação do látex fixado em anticorpos antilipase ou formação de um produto corado através de um anticorpo contra lipase conjugado com peroxidase. Metodologia turbidimétrica também tem sido empregada, e a atividade enzimática é diretamente proporcional à diminuição na turbidez gerada pelo consumo de substrato (emulsão óleo-água). Métodos espectrofotométricos acoplados a reações enzimáticas têm sido desenvolvidos para avaliação da lipase. Geralmente esses métodos têm menor custo e são de fácil realização. O produto final da reação da lipase é o glicerol, o qual é determinado enzimaticamente com a formação de um cromógeno (metilresorufina) com absorção máxima em 570 nm. As condições de ensaio permitem o consumo de glicerol endógeno para que não interfira na reação.

Tripsina e tripsinogênio

Nas células acinares humanas a enzima Tripsina (EC 3.4.21.4) é sintetizada na forma de proenzima inativa, o Tripsinogênio. Ela hidrolisa as ligações peptídicas entre resíduos de lisina ou arginina com outros resíduos de aminoácidos de cadeias polipeptídicas. Ela pertence à família das serinas proteases e apresenta peso molecular entre 23.400 a 25.000 dáltons. O pH ótimo da enzima para os substratos naturais está entre 8,0 a 10,0. Cálcio e magnésio são ativadores de sua atividade, e ânions como cianetos, citratos, fluoretos e sulfetos, bem como compostos orgânicos podem inibi-la.

Por meio de eletroforese é possível detectar duas formas predominantes da proenzima: a catiônica, o tripsinogênio-1; e a aniônica, o tripsinogênio-2. Cerca de 20% das proteínas totais do suco pancreático são representadas pelos dois tripsinogênios. Dois terços desse total é constituído pela forma catiônica. As proenzimas são convertidas nas enzimas ativas na luz do duodeno por ação da enteroquinase. Essa protease intestinal cliva uma porção de 5 a 8 resíduos aminoterminais dessas proenzimas, o peptídeo de ativação da tripsina (TAP, do inglês, *tripsinogen activation peptide)*.

No ser humano ela é produzida quase exclusivamente no pâncreas, com pouquíssima atividade enzimática encontrada nas células intestinais. Pequena concentração dessas enzimas e suas proenzimas estão presentes na circulação. As enzimas são rapidamente inativadas pela complexação com os inibidores α_1-antitripsina e α_2-macroglobulina. O sistema retículo endotelial retira de circulação os complexos formados rapidamente. As proenzimas, devido ao seu pequeno tamanho, são livremente filtradas nos glomérulos, sendo o tripsinogênio-1 reabsorvido e catabolizado em maior proporção pelas células tubulares. O tripsinogênio-2 (aniônica) é, assim, o maior componente verificado na urina em contraste ao seu conteúdo no sangue, onde a proenzima catiônica é mais abundante.

Imunoensaios são empregados para a determinação de tripsina e seus produtos em soro e urina. O imunoensaio, denominado tripsina imunorreativa (IRT), detecta a forma tripsina-1 complexada ao inibidor plasmático, bem como tripsinogênio-1. Rotineiramente, sua utilidade no diagnóstico clínico de pancreatites não apresenta significativa diferença se comparado aos ensaios para amilase e lipase.

Em crianças com fibrose cística a tripsina imunorreativa tem sido empregada para triagem neonatal (teste do pezinho). A tripsina imunorreativa é realizada conjuntamente ao teste de fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito e hemoglobinopatias. Ao nascimento, crianças com fibrose cística podem apresentar níveis elevados de tripsinogênio os quais rapidamente caem para níveis abaixo da normalidade após os trinta dias de vida.

Estudos de avaliação de programas de triagem neonatal para fibrose cística no Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Santa Catarina têm demonstrado incidências de 1:9.520, 1.8403, 1:9.115 e 1:8.776 respectivamente. Foram empregados pontos de corte no valor de 70 ng/mL (papel filtro com sangue total) para a IRT na primeira e na segunda dosagem (caso a coleta ocorresse entre 3 a 4 semanas de vida), representando o percentil 99,8% de população.

A pesquisa do tripsinogênio-2 urinário e sérico por imunometria tem sido implementada e parece ter utilidade similar àquela encontrada para a amilase sérica, sendo considerado um teste de boa capacidade para descartar pancreatites agudas em emergências hospitalares. A implementação de metodologia imunocromatográfica em tiras reativas tem facilitado sua disseminação para avaliação clínica, e estudos revelam sensibilidade diagnóstica variando entre 68% a 100%, e especificidade diagnóstica em torno de 85% a 96%. Esse teste parece ter excelente capacidade discriminatória de severidade nas pancreatites agudas, sendo recomendado seu uso com este fim.

CASOS CLÍNICOS

Caso 1

Uma mulher de 65 anos apresentando dores abdominais, náuseas e vômitos nos últimos três dias foi atendida na emergência de um hospital. Tinha histórico de Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) prévio, hipertensão desde os 50 anos, e hiperlipidemia. Sem histórico familiar ou próprio de pancreatite, além de a paciente ter relatado não ingerir álcool e também nenhum trauma. Medicações que usava de forma constante incluíam enalapril, atenolol e rosuvastatina. Era alérgica a vários antibióticos. Recentemente havia substituído o seu agente hipolipemiante, e a dose de rosuvastatina era de 20 mg ao dia. Apresentava abdome distendido, com sensibilidade na região superior, e níveis plasmáticos de amilase de 1.278 U/L (referência, 25 a 115 U/L), lipase de 11.790 U/L (referência 73-393 U/L), as atividades das aminotransferases (ALT e AST), fosfatase alcalina e gamaglutamil-transferase encontravam-se dentro das faixas de referência, assim como bilirrubinas totais. O hemograma apresentou parâmetros dentro dos limites de referência. O perfil lipídico também estava dentro da faixa referencial, assim como troponinas e os marcadores tumorais CA 19-9 e CEA. Foi solicitada ultrassonografia abdominal, que indicou inexistência de coledocolitíase e tomografia computadorizada abdominal que revelou edema pancreático sem necrose ou calcificação. A suspensão do uso de rosuvastatina melhorou o quadro clínico da paciente, que recebeu alta em poucos dias.

1. Qual é a provável suspeita clínica?
   a) carcinoma pancreático;
   b) hepatite;
   c) pancreatite;
   d) litíase biliar.
2. Considerando a confirmação da suspeita clínica pelos resultados dos exames de imagem solicitados, qual seria a causa provável desta?
   a) medicamentosa;
   b) alcoólica;
   c) hiperlipidemia;
   d) biliar.
3. A atividade de lipase estar dez vezes mais elevada do que a de amilase é justificada, pois?
   a) O pâncreas apresenta níveis de amilase e lipase em concentrações diferenciadas e a variação está associada às técnicas empregadas na dosagem.
   b) O pâncreas apresenta níveis de amilase e lipase em concentrações iguais e a variação está associada com maior meia-vida da lipase na circulação geral.
   c) O pâncreas apresenta níveis de amilase e lipase em concentrações diferenciadas e a variação está associada com maior meia-vida da amilase na circulação geral.
   d) O pâncreas apresenta níveis de amilase e lipase em concentrações diferenciadas, determinando níveis plasmáticos mais persistentes da lipase presente em maior concentração, e uma menor meia-vida da amilase.

Caso 2

Um universitário de 19 anos com histórico anterior de pancreatite aguda deu entrada na emergência pela manhã, com dor abdominal epigástrica. O paciente estava febril, e tivera dificuldade em dormir devido à dor iniciada às 23 horas. Horas antes havia ingerido vodca e cerveja em quantidade apreciável em uma festa de sua turma da faculdade. Apresentava-se edemaciado. Os resultados dos exames laboratoriais realizados em amostra sanguínea coletada com EDTA foram hematócrito de 46,4 (41,0-53,0 VR homens), hemoglobina 17,2 g/dL (13,5-17,5 g/dL; VR homens); Leucócitos 5.200/mm^3 (5.000 a 10.000/mm^3); Amilase 110 U/L (referência, 25 a 115 U/L); gamaglutamil-transferase 120 U/L (< 60 U/L, VR homens) creatinina 3,0 mg/dL (0,4 a 1,4 mg/dL, VR) no exame de urina de rotina foi observado proteínas positivo (++++); com 30.000 células renais/mL, cilindros granulosos 3.000/mL e cilindros celulares 1.000/mL. Foi solicitada ultrassonografia de abdome, o qual revelou ausência de litíase biliar e ascite. O pâncreas não foi bem visualizado devido aos gases intestinais. Foi realizado o tripsinogênio-2 urinário com resultado positivo. Uma tomografia computadorizada do abdome com contraste venoso foi realizada após o quinto dia de hospitalização, quando o quadro renal já havia normalizado. O paciente permaneceu em unidade de tratamento intensivo por 15 dias, sendo posteriormente transferido para enfermaria, recebendo alta após vinte dias de internação. Sendo realizados previamente testes genéticos para mutações em PRSS1, SPINK1 e CFTR. Duas mutações neste último gene foram detectadas.

1. Considerando que a confirmação da suspeita clínica pelos resultados dos exames de imagem solicitados foi pancreatite aguda, qual seria a causa provável desta?
   a) medicamentosa;
   b) hiperlipidemia;
   c) genética desencadeada pelo álcool.
2. A Insuficiência Renal Aguda desencadeada pela doença de base deste paciente pode ser percebida pelo valor de creatinina plasmática e presença de:
   a) Cilindros granulosos e celulares decorrentes da necrose tubular aguda.
   b) Cilindros granulosos e celulares decorrentes da glomerulonefrite aguda.
   c) Cilindros granulosos e celulares decorrentes da síndrome nefrótica.
   d) Cilindros verificados e das células renais associadas à pielonefrite.
3. O tripsinogênio urinário foi útil para o não descarte da suspeita clínica inicial. A amilase, entretanto, estava com valores normais. Qual a justificativa para este fato?
   a) Amilase apresenta-se diminuída na insuficiência renal aguda (IRA).
   b) O tripsinogênio-2 não sofre alteração em sua concentração no caso de IRA.
   c) Amilase e tripsinogênio-2 não têm correlação clínica com a doença diagnosticada.
   d) O valor de amilase total foi inibido devido ao EDTA, quelante de cálcio.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Al-Bahrani AZ, Ammori BJ. Clinical laboratory assessment of acute pancreatitis. Clin Chim Acta. 2005 Dec;362(1-2):26-48.
2. Apte MV, Pirola RC, Wilson JS. Mechanisms of alcoholic pancreatitis. J Gastroenterol Hepatol. 2010 Dec;25(12):1816-26.
3. Apte MV, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas. Front Physiol. 2012;3:344.
4. Bai HX, Giefer M, Patel M, et al. The association of primary hyperparathyroidism with pancreatitis. J Clin Gastroenterol. 2012 Sep;46(8):656-61.
5. Braganza JM, Lee SH, McCloy RF, et al. Chronic pancreatitis. Lancet. 2011 Apr 2;377(9772):1184-97.
6. BRASIL. Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) TABNET/DATASUS. Brasília, 2016. Disponível em: < http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/nruf.def >. Acesso em: 06/08/2016.
7. BRASIL. Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) TABNET/DATASUS. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. [Acesso em 30 mar 2017]. Disponível em: http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203
8. Chen N, Unnikrishnan IR, Anjana RM, et al. The complex exocrine-endocrine relationship and secondary diabetes in exocrine pancreatic disorders. J Clin Gastroenterol. 2011 Nov-Dec;45(10):850-61.
9. Cunha RM, Mott CdB, Guarita DR, et al. Complicações das Pancreatites Crônicas em São Paulo. Rev Hosp Clin. 1997;52(6):306-15.
10. Della Manna T, Setian N, Rodrigues JC. [Cystic fibrosis-related diabetes: a frequent co-morbidity]. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2008 Mar;52(2):188-97.
11. Dufour DR. The Pancreas: Function and Chemical Pathology. In: Kaplan LA, Pesce AJ. Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation. St. Louis: Mosby Elsevier, 2010. p.651-62.
12. Egerbacher M, Bock P. Morphology of the pancreatic duct system in mammals. Microsc Res Tech. 1997 Jun 1-15;37(5-6):407-17.
13. Fogaça HS, Barros LVd. Pancreatite Crônica - 1- Abordagem Clínica. In: Fogaça HS, Elia CCS. Rotinas do Serviço de Gastroenterologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ - Gastroenterologia: Doenças do Pâncreas e das Vias Biliares. 1.ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, 2006. p.31-51.
14. Freitas GAPd, Fogaça HS. Pancreatite Aguda - 1 Abordagem Clínica. In: Fogaça HS, Elia CCS. Rotinas do Serviço de Gastroenterologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ - Gastroenterologia: Doenças do Pâncreas e das Vias Biliares. 1.ed. Rio de Janeiro- RJ: Livraria e Editora Revinter, 2006. p.5-15.
15. Frick TW. The role of calcium in acute pancreatitis. Surgery. 2012 Sep;152(3 Suppl 1):S157-63.
16. Frossard JL, Steer ML, Pastor CM. Acute pancreatitis. Lancet. 2008 Jan 12;371(9607):143-52.
17. Goldberg DM, Durie PR. Biochemical tests in the diagnosis of chronic pancreatitis and in the evaluation of pancreatic insufficiency. Clin Biochem. 1993 Aug;26(4):253-75.
18. Guimarães-Filho AC, Maya MCA, Leal PR. Pancreatite aguda: etiologia, apresentação clínica e tratamento. Rev Hosp Universit Pedro Ernesto. 2009;8(1):61-9.
19. Hall JE. Funções Secretoras do Trato Alimentar. In: Hall JE. Guyton and Hall tratado de fisiologia médica. 12.ed. Rio de Janeiro: Saunders/Elsevier, 2011. p.815-30.
20. Hall JE. Insulina, Glucagon e Diabetes Mellitus. In: Hall JE. Guyton and Hall tratado de fisiologia médica. 12.ed. Rio de Janeiro: Saunders/Elsevier, 2011. p.987-1004.
21. Henderson AR, Tietz NW, Rinker AD. Gastric, Pancreatic, and Intestinal Function. In: Burtis CA, Ashwood ER, Tietz NW. Tietz textbook of clinical chemistry. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1986. p.1576-644
22. Houaiss A, Villar MdS. Dicionário Houaiss da língua portuguesa. 1.ed. Rio de Janeiro: Objetiva, 2009.
23. Hruban RH, Iacobuzo-Donahue C. O Pâncreas. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, et al. Robbins and Cotran Patologia As bases patológicas das doenças. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier Saunders, 2010. p.899-912.
24. Kazmierczak SC, Van Lente F, Hodges ED. Diagnostic and prognostic utility of phospholipase A activity in patients with acute pancreatitis: comparison with amylase and lipase. Clin Chem. 1991 Mar;37(3):356-60.
25. Kazmierczak SC. Biochemical Indicators of Acute Pancreatitis. In: Lott JA. Clinical pathology of pancreatic disorders. Totowa: Humana Press, 1997. p.75-124.
26. Kemppainen EA, Hedstrom JI, Puolakkainen PA, et al. Rapid measurement of urinary trypsinogen-2 as a screening test for acute pancreatitis. N Engl J Med. 1997 Jun 19;336(25):1788-93.
27. Kylanpaa-Back ML, Kemppainen E, Puolakkainen P. Trypsin-based laboratory methods and carboxypeptidase activation peptide in acute pancreatitis. JOP. 2002 Mar;3(2):34-48.
28. Leclerc P, Forest JC. Variations in amylase isoenzymes and lipase during acute pancreatitis, and in other disorders causing hyperamylasemia. Clin Chem. 1983 Jun;29(6):1020-3.
29. Lempinen M, Stenman UH, Finne P, et al. Trypsinogen-2 and trypsinogen activation peptide (TAP) in urine of patients with acute pancreatitis. J Surg Res. 2003 May 15;111(2):267-73.
30. Leung PS, Ip SP. Pancreatic acinar cell: its role in acute pancreatitis. Int J Biochem Cell Biol. 2006;38(7):1024-30.
31. Maitra A. O Sistema Endócrino. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, et al. Robbins and Cotran Patologia As bases patológicas das doenças. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier Saunders, 2010. p.1105-72.
32. Matull WR, Pereira SP, O'Donohue JW. Biochemical markers of acute pancreatitis. J Clin Pathol. 2006 Apr;59(4):340-4.
33. Mayumi T, Inui K, Maetani I, et al. Validity of the urinary trypsinogen-2 test in the diagnosis of acute pancreatitis. Pancreas. 2012 Aug;41(6):869-75.
34. McNeely MDD. Amylase. In: Kaplan LA, Pesce AJ. Clinical Chemistry: theory, analysis and correlation. 2.ed. St. Louis: Mosby, 1989. p.906-9.
35. McNeely MDD. Pancreatic function. In: Kaplan LA, Pesce AJ. Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation. 2.ed. St. Louis: Mosby, 1989. p.390-7.
36. Mitchell RM, Byrne MF, Baillie J. Pancreatitis. Lancet. 2003 Apr 26;361(9367):1447-55.
37. Moss DW, Henderson AR. Enzymes. In: Burtis CA, Ashwood ER, Tietz NW. Tietz textbook of clinical chemistry. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1986. p.735-896.
38. Mott CdB, Guarita DR, Pinheiro e Coelho ME, et al. Etiologia das Pancreatites Crônicas em São Paulo: Estudo de 407 casos. Rev Hosp Clin. 1989;44(5):214-20.

39. Motta PM, Macchiarelli G, Nottola SA, et al. Histology of the exocrine pancreas. Microsc Res Tech. 1997 Jun 1-15;37(5-6):384-98.
40. O'Morchoe CC. Lymphatic system of the pancreas. Microsc Res Tech. 1997 Jun 1-15;37(5-6):456-77.
41. Pacheco RC, Nishioka SdA, Oliveira LCMd. Validade da amilasemia e da lipasemia no diagnóstico diferencial entre pancreatite aguda/crônica agudizada e outras causas de dor abdominal aguda. Arq Gastroenterol. 2003;40(4):233-8.
42. Pacheco RC, Oliveira LCMd. Relação lipase/amilase nas pancreatites agudas de causa biliar e nas pancreatites agudas/crônicas agudizadas de causa alcoólica. Arq Gastroenterol. 2007;44(1):35-8.
43. Pavlidis TE, Pavlidis ET, Sakantamis AK. Advances in prognostic factors in acute pancreatitis: a mini-review. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2012 Oct;9(5):482-6.
44. Porto JD, Ximenes JAA, Correa SPS, et al. Pancreatite Crônica: Estudo Epidemiológico de trinta e seis casos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás (1983/87). Rev Goiana Med. 1988;34:25-8.
45. Reed AM, Husain SZ, Thrower E, et al. Low extracellular pH induces damage in the pancreatic acinar cell by enhancing calcium signaling. J Biol Chem. 2011 Jan 21;286(3):1919-26.
46. Rockenbach R, Russi RF, Sakae TM, et al. Perfil dos pacientes internados com pancreatite aguda nos serviços de gastroenterologia clínica e cirurgia geral do Hospital Santa Clara, do Complexo Hospitalar Santa Clara, Porto Alegre/RS, no periodo de 2000 a 2004. Arq Catarinenses Med. 2006;35(4):25-35.
47. Rodrigues R, Gabetta CS, Pedro KP, et al. Cystic fibrosis and neonatal screening. Cad Saude Publica. 2008;24 Suppl 4:s475-84.
48. Rodrigues R, Magalhaes PK, Fernandes MI, et al. Neonatal screening for cystic fibrosis in Sao Paulo State, Brazil: a pilot study. Braz J Med Biol Res. 2009 Oct;42(10):973-8.
49. Sah RP, Garg P, Saluja AK. Pathogenic mechanisms of acute pancreatitis. Curr Opin Gastroenterol. 2012 Sep;28(5):507-15.
50. Salt WB 2nd, Schenker S. Amylase--its clinical significance: a review of the literature. Medicine (Baltimore). 1976 Jul;55(4):269-89.
51. Santos GP, Domingos MT, Wittig EO, et al. [Neonatal cystic fibrosis screening program in the state of Parana: evaluation 30 months after implementation]. J Pediatr (Rio J). 2005 May-Jun;81(3):240-4.
52. Santos JSd, Elias Júnior J, Scarpelini S, et al. Pancreatite Aguda: Atualização de conceitos e condutas. Medicina (Ribeirão Preto). 2003;36:266-82.
53. Skude G. Pancreatic isoamylase as a routine test. eJIFCC. 2000;1:1-12.
54. Smotkin J, Tenner S. Laboratory diagnostic tests in acute pancreatitis. J Clin Gastroenterol. 2002 Apr;34(4):459-62.
55. Tan GD. The pancreas. Anaesth Intensive Care Med. 2011;12(10):469-72.
56. Tando Y, Yanagimachi M, Matsuhashi Y, et al. A brief outline of the history of the pancreatic anatomy. Dig Surg. 2010;27(2):84-6.
57. Tietz NW, Shuey DF. Lipase in serum--the elusive enzyme: an overview. Clin Chem. 1993 May;39(5):746-56.
58. Tietz NW. Support of the diagnosis of pancreatitis by enzyme tests--old problems, new techniques. Clin Chim Acta. 1997 Jan 3;257(1):85-98.
59. Tseng CW, Chen CC, Lin SZ, et al. Rapid urinary trypsinogen-2 test strip in the diagnosis of pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography. Pancreas. 2011 Nov;40(8):1211-4.
60. Van Lente F. Exocrine Disorders of the Pancreas. In: Lott JA. Clinical pathology of pancreatic disorders. Totowa: Humana Press, 1997. p.27-73.
61. Vissers RJ, Abu-Laban RB, McHugh DF. Amylase and lipase in the emergency department evaluation of acute pancreatitis. J Emerg Med. 1999 Nov-Dec;17(6):1027-37.
62. Wayland H. Microcirculation in pancreatic function. Microsc Res Tech. 1997 Jun 1-15;37(5-6):418-33.
63. Whitcomb DC. Genetic aspects of pancreatitis. Annu Rev Med. 2010;61:413-24
64. Wu WT, Beeler MF, Kao YS. Estudo da Função Exócrina do Pâncreas. In: Henry JB. Diagnósticos Clínicos e Conduta Terapêutica por exames laboratoriais. 16.ed. São Paulo: Editora Manole, 1982. p.813-34.
65. Yadav D, Agarwal N, Pitchumoni CS. A critical evaluation of laboratory tests in acute pancreatitis. Am J Gastroenterol. 2002 Jun;97(6):1309-18.

9

capítulo

Aline Borsato Hauser

Doenças Renais

INTRODUÇÃO

O rim é órgão par, localizado no espaço retroperitoneal, em formato de feijão, com coloração avermelhada. Nos indivíduos adultos, cada rim apresenta em torno de 12 cm de altura e cerca de 150 g, sendo o rim direito levemente inferior ao rim esquerdo. Dentre as diversas funções renais destacam-se a eliminação de catabólitos produzidos diariamente, a regulação da homeostase hidroeletrolítica, a manutenção do equilíbrio acidobásico, a regulação da pressão arterial sistêmica, a síntese de hormônios, e a degradação de peptídeos circulantes.

O rim apresenta duas faces, dois bordos e duas extremidades (Figura 9.1). O hilo renal está situado na borda medial, com uma reentrância por onde entram e saem artérias e veias, nervos, vasos linfáticos e ureter. O rim apresenta um tecido homogêneo, que se distribui perifericamente, conhecido como córtex renal, e uma região central, a medula renal. A medula renal possui prolongamentos que formam as colunas renais, onde se localizam as pirâmides renais, que apresentam disposição raiada por onde a urina goteja nos pequenos cálices. Esses pequenos cálices em número de quatro formam um grande cálice, que desemboca no ureter.

Para que se entenda o uso dos biomarcadores renais na prática clínica e laboratorial é imprescindível que se compreenda o processo fisiológico de formação da urina, assim como a patogenia das principais doenças renais.

A formação da urina se dá por meio de um fluxo sanguíneo renal, da filtração glomerular e dos processos tubulares de reabsorção e secreção. Tais processos ocorrem na unidade funcional dos rins, ou seja, nos néfrons. Existe cerca de 1,5 milhão de néfrons por rim (Figura 9.2), que uma vez lesionados, perdem sua função de forma irreversível. Cada néfron apresenta Glomérulo, Túbulo Contorcido Proximal (TCP), Alça de Henle (AH), Túbulo Contorcido Distal (TCD) e Tubo Coletor.

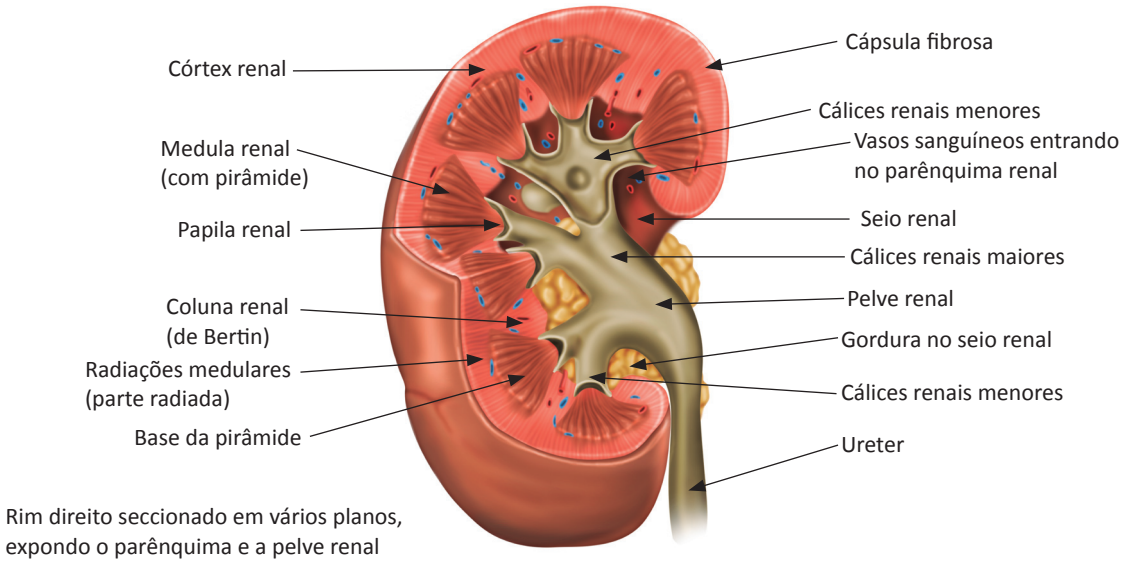


Figura 9.1 Rim direito seccionado em vários planos, expondo o parênquima e a pelve renal.
Fonte: Riella, 2010.

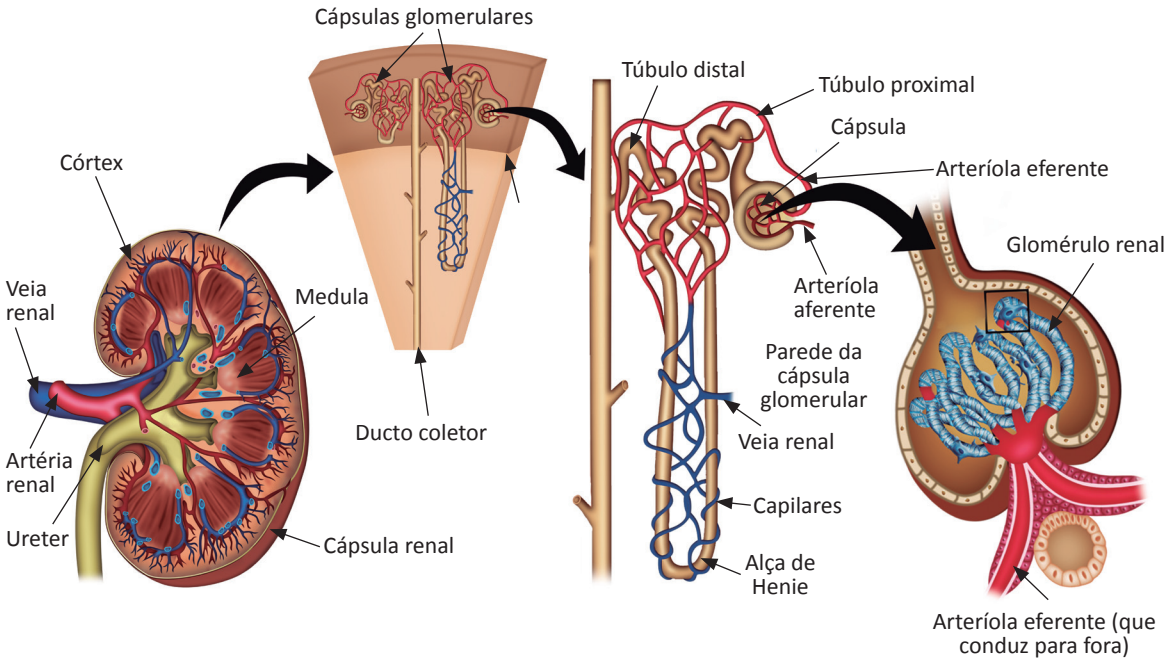


Figura 9.2 Apresentação do rim em corte longitudinal, e o néfron, sua unidade funcional.
Fonte: Adaptada de Cheida, 2002.

Filtração glomerular

O glomérulo é um ultrafiltro corpuscular arredondado, com lobos capilares em espiral, com aproximadamente 0,2 mm de diâmetro, contido numa espécie de saco conhecido como Cápsula de Bowman. A filtração glomerular é um processo físico que ocorre por meio de barreiras não seletivas, que retém substâncias conforme o peso molecular (pm). Basicamente, ficam retidas as células e as proteínas de alto pm (> 70000 D), apresentando permeabilidade variável para proteínas entre 15.000 e 70.000 D e permeabilidade para proteínas pm < 15.000 D. Daí vêm os valores de referência (VR) para proteinúria, em urina ao acaso, entre 0 e 10 mg/dL, e urina de 24 horas entre 0 e 150 mg/24 horas.

Reabsorção tubular

Ocorre por transporte ativo e/ou passivo de substâncias do interior do túbulo renal para os capilares peritubulares que o circundam. Aproximadamente 99% do filtrado é reabsorvido. São filtrados aproximadamente 125 mL de sangue por minuto para a formação de 1 mL de urina. O excedente (124 mL) corresponde às substâncias essenciais ao organismo como água, glicose, aminoácidos, que são reabsorvidas durante a passagem do filtrado pelos túbulos renais. O Limiar Renal corresponde à concentração acima da qual a substância não será reabsorvida e aparece na urina, como exemplo, a glicose. Isso ocorre porque os processos de reabsorção são saturáveis, apresentando um limite específico para cada substância. No exemplo da glicose o limiar renal corresponde à concentração plasmática de cerca de 160 a 180 mg/dL, apesar de este valor apresentar variabilidade entre os indivíduos. No TCP ocorre reabsorção de água (80%) secundária à reabsorção dos solutos (70% Na^+, 100% glicose, K^+, Mg^{++}, ureia, fosfato, ácido úrico). No ramo descendente da AH ocorre reabsorção de água, mas é impermeável aos solutos, enquanto, no ramo ascendente da AH ocorre reabsorção dos solutos, sendo impermeável à água. O TCD sofre ação da aldosterona (sistema renina-angiotensina-aldosterona) para reabsorver o Na^+ e secretar H^+ e K^+, regula a excreção do Ca^+ e, nas porções finais do TCD e TC ocorre a ação do hormônio antidiurético (ADH) conforme o estado de hidratação do organismo.

Secreção tubular

É um processo pelo qual os solutos saem dos capilares peritubulares para os túbulos renais por transporte ativo, ou seja, ocorre a secreção das substâncias como H^+ (TCP), K^+(TC), fosfato, drogas, medicamentos e outras substâncias secretadas, que finalmente vão compor a urina.

PRINCIPAIS PATOLOGIAS RENAIS

As principais patologias renais glomerulares e tubulares estão descritas no Quadro 9.1. A filtração da maioria das proteínas plasmáticas e células sanguíneas é dificultada pelas características físico-químicas e de carga eletrostática da membrana glomerular. As patologias glomerulares são compatíveis com a presença de proteinúria e hematúria, consideradas pelo *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)* como importantes sinais precoces de doença renal, assim as glomerulopatias representam doença renal potencialmente progressiva e podem levar ao desenvolvimento de insuficiência renal aguda ou crônica.

Quadro 9.1 Principais patologias glomerulares e tubulares.

Patologias glomerulares	Principais características
Glomeruloesclerose focal	"Focal" indica que apenas alguns glomérulos são afetados, sendo que inicialmente afeta os glomérulos justamedulares no córtex renal.
Síndrome nefrótica	Caracterizada por edema, proteinúria maciça, hipoproteinemia e hiperlipemia.
Nefropatia membranosa	Histologicamente, caracteriza-se por um espessamento regular e difuso da membrana basal capilar devido à formação de complexos imunes.
Nefropatia diabética	É uma das complicações do *diabetes mellitus* devido a uma microangiopatia diabética. As lesões mais importantes são glomeruloesclerose diabética e espessamento das arteríolas glomerulares aferentes.
Glomerulonefrite aguda	Ocorre edema, hipertensão e oligúria cerca de 1-3 semanas após infecção por estreptococo β-hemolítico do grupo A. Os complexos imunes formados se depositam na parede capilar glomerular.
Glomerulonefrite progressiva	Pode surgir como doença primária ou secundária, sendo causada por uma inflamação severa do capilar glomerular que pode progredir para DRC dentro de semanas a meses.
Nefropatia por IgA	Encontram-se depósitos granulares de IgA e complemento na área mesangial glomerular, sendo que é uma das principais causas de DRC.
Patologias tubulares	**Principais características**
Pielonefrite aguda/crônica	É considerada infecção do trato urinário ascendente, que afeta quase todas as estruturas do rim, incluindo os túbulos. A forma aguda é causada por uma infecção bacteriana, e a crônica ocorre por infecções de repetição que levam a uma reação do sistema imune produzindo um quadro de lesões. Caracterizada por presença ou não de bacteriúria (urocultura positiva ou negativa), intensa leucocitúria e presença de cilindros leucocitários na urina.
Litíases	É doença calculosa renal com diversos fatores clínicos e biológicos envolvidos na litogênese. Laboratorialmente, pode ser solicitada a análise da composição química do cálculo e o parcial de urina apresenta hematúria microscópica com ou sem a presença do cristal correspondente.

Fonte: Adaptado de Hauser AB, 2008; Hauser AB, 2009.

DOENÇA RENAL CRÔNICA

A Doença Renal Crônica (DRC) é caracterizada por perda progressiva e irreversível da função renal, ocasionada por lesão dos néfrons por um período igual ou superior a três meses. Inicialmente a DRC era classificada em estágios, de acordo com a medida da taxa de filtração glomerular (TFG), e os pacientes com TFG < 15 mL/min apresentavam insuficiência renal terminal, sendo necessária a terapia substitutiva da função renal (diálise ou transplante). Atualmente, a classificação prognóstica para DRC, de acordo com o *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (*KDIGO*, 2012) considera a TFG e a albuminúria. A cor azul indica que não há DRC se não houver outros marcadores que a definam; amarelo indica risco moderado; laranja, alto risco; e vermelho, risco muito alto (Quadro 9.2).

A DRC constitui importante problema de saúde pública em todo o mundo. Segundo Censo 2011 da Sociedade Brasileira de Nefrologia, existe cerca de 10 milhões de brasileiros com DRC nos cinco estágios, aproximadamente 90 mil pacientes em estágio final, recebendo terapia substitutiva de função renal, e a taxa de mortalidade anual estimada é de 14 mil pacientes dialíticos. A DRC é multicausal, tratável de várias maneiras, controlável, mas incurável, progressiva e com elevada morbidade e letalidade. O esclarecimento da população sobre o significado e a natureza assintomática e progressiva da doença, bem como o controle dos fatores de risco são passos importantes para a prevenção primária. Assim como a utilização de biomarcadores laboratoriais para o reconhecimento precoce de pacientes em estágios iniciais da DRC poderia reduzir o aumento no número dos pacientes urêmicos, e a alta taxa de mortalidade.

Quadro 9.2 Classificação prognóstica para a doença renal crônica (DRC).

Taxa de filtração glomerular (Categorias, descrição e faixas)			Albuminúria (Categorias, descrição e faixas)		
			A1	A2	A3
			Normal a levemente aumentada	Moderadamente aumentada	Severamente aumentada
			< 30 mg/g	30-300 mg/g	> 300 mg/g
G1	Normal ou aumentada	≥ 90			
G2	Levemente diminuída	60-89			
G3a	Levemente a moderadamente diminuída	45-59			
G3b	Moderadamente a severamente diminuída	30-44			
G4	Severamente diminuída	15-29			
G5	Insuficiência renal	<15			

Fonte: KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes, 2012).

Legenda: Branco = não há DRC, se não houver outros marcadores; Cinza = risco moderado; Azul = risco alto e Preto = risco muito alto.

BIOMARCADORES NO DIAGNÓSTICO DA DRC

Creatinina sérica e taxa de filtração glomerular

A avaliação laboratorial da função renal é extremamente importante para se diagnosticar e estadiar o paciente com DRC (Quadro 9.2). A maneira mais importante para se mensurar a função renal é a medida da Taxa de Filtração Glomerular (TFG). A dosagem de creatinina sérica fornece informação sobre a TFG, mas não é um bom marcador para se estimar a FG se usado de forma isolada.

A creatinina é um produto residual da creatina, que está presente na fibra muscular com função energética. De forma espontânea, a creatina perde água e se transforma na creatinina, que sem atividade biológica é liberada na circulação para ser excretada pelos rins. As vantagens da dosagem de creatinina são precisão e custo adequados por conta dos métodos utilizados, como a reação de Jaffé e métodos enzimáticos específicos. Em relação aos aspectos analíticos da dosagem de creatinina, a reação de Jaffé sofre interferências *in vitro*, positiva por cefalosporinas e corpos cetônicos, e negativa por bilirrubina; e os métodos enzimáticos sofrem interferência de N-acetilcisteína e dipirona. Além das interferências analíticas, o ritmo de excreção da creatinina não é constante entre os indivíduos e a sua concentração é uma combinação de filtração e secreção, podendo ser pouco precisa, principalmente em pacientes com disfunção renal, lembrando que o ideal para uma substância ser usada como marcador da FG é que seja totalmente filtrada (nem secretada e nem reabsorvida). Acredita-se que aproximadamente 50% dos indivíduos com baixa TFG ainda apresentam creatinina sérica dentro dos limites de normalidade. Outra desvantagem é a interferência por fatores independentes da FG, tais como: massa muscular, idade, sexo, raça, superfície corporal, dieta e drogas. Como a creatinina é derivada do metabolismo da creatina muscular, a sua produção é diretamente proporcional à massa muscular. Assim, é de se esperar que a sua produção seja maior nos homens do que nas mulheres, e maior nos jovens comparados aos idosos. A influência da raça é importante em alguns grupos étnicos e raças.

O exame laboratorial em urina de 24 horas, *clearance de creatinina*, é ainda muito solicitado, mas em geral não é mais confiável para medir a TFG do que se calculada por equações. Esse fato pode ser justificado por erros de coleta, como dificuldade em colher a urina de 24 horas, e as variações diárias na excreção da creatinina, além das já comentadas.

Taxa de filtração glomerular estimada (TFGe)

Segundo Pecoits-Filho (2004), o valor da creatinina sérica ajustado por meio das equações para se calcular a TFG deve ser utilizado como escolha para a avaliação da função renal. O uso das equações tem como vantagem fornecer um ajuste para as variações que interferem na produção de creatinina como sexo, idade, superfície corporal e raça.

Conforme Quadro 9.3, várias equações foram desenvolvidas para predizer a TFG em adultos e crianças. A Equação de Cockcroft-Gault foi amplamente usada e validada. A única desvantagem é a ausência de padronização para a área da superfície corporal. Posteriormente foi desenvolvida a fórmula *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD), que permite o ajuste de acordo com a área de superfície corporal e sua ver-

são simplificada necessita apenas de dados relacionados à idade, sexo e raça. No Brasil, a definição da raça pode ser um fator limitante, devido à intensa miscigenação racial. Atualmente, recomenda-se a utilização da fórmula do "*The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration Equation*" (*CKD-EPI*), que diminui a discrepância observada entre a TFGe e TFG real determinada com padrão-ouro iotalamato (marcador exógeno), além de ser um bom preditor de risco para DRC. Lembrando que para valores da FG < 60 mL/min/1,73 m^2, a correlação entre TFGe, utilizando qualquer uma das equações, e a TFG real, é muito boa. Em pediatria, a equação de Schwartz e a de Counahan-Barrat são utilizadas e se baseiam na altura como estimativa da massa muscular, apesar de que esta fórmula se torna imprecisa à medida que a TFG cai. Em idosos, o diagnóstico de DRC deve ser estabelecido com base em outro marcador, além da TFG, devido ao fato de que a TFG diminui como parte do processo de envelhecimento do organismo, sendo difícil estabelecer diferenças entre diminuição da TFG relacionada com a idade ou com a DRC.

Existem calculadores *on-line* no site da Sociedade Brasileira de Nefrologia (www.sbn.org.br) ou da *National Kidney Foundation* (www.kidney.org), que facilitam o uso das fórmulas. Dentro desse contexto, recomenda-se que os laboratórios determinem a TFGe (CKD-EPI) a partir das dosagens séricas de creatinina sempre que estas forem solicitadas (simultaneamente aos cálculos do *clearance de creatinina*).

O exame parcial de urina e sua correlação com os demais biomarcadores

Tanto nos casos em que é difícil estabelecer diferenças entre diminuição da TFG relacionada com a idade ou com a DRC, quanto na população em geral, o exame parcial de urina pode representar importante auxílio no diagnóstico das doenças renais. A detecção de hemácias e de proteínas pode ser o primeiro sinal de que há problema renal. Em casos mais avançados podem aparecer os cilindros, únicos elementos exclusivamente renais (Figura 9.3). Os cilindros se formam

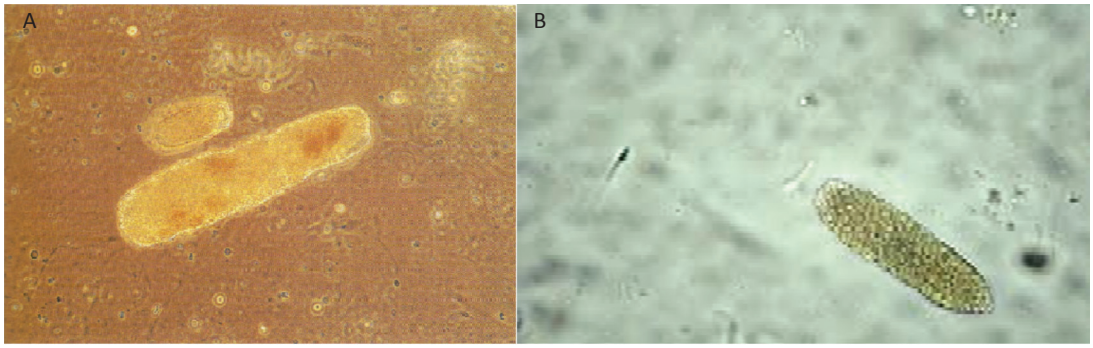


Figura 9.3 **(A)** Cilindro eritrocitário granular e **(B)** Cilindro granuloso.
Fonte: Adaptada de Birch, D.F.; *et al*., 2001.

Quadro 9.3 Fórmulas usadas para estimar a TFG (TFGe).

Equação de Cockroft-Gault: TFGe (mL/min) = (140-idade) × peso × (0,85 se mulher)/72 × $creat_{ser}$
Equação MDRD simplificada: TFGe (mL/min/1,73 m^2) = 186 × $(creat_{ser})^{-1154}$ × $idade^{-0,203}$ × (0,742 se mulher) × (1,210 se negro)
Equação CKD - EPI: TFGe (mL/min/1,73m^2) = 141 × [min(Scr/k),1)_ × max(Scr/k),1) -1,209 × idade-0,993 × 1,018 (se mulher) × 1,157 (se negro) α = 0,329 se mulher, e 0,411 se homens; κ = 0,7 se mulher, e 0,9 se homem
Fórmula de Schwartz: TFGe (mL/min) = 0,55 × altura/$creat_{ser}$
Equação de Counahan-Barratt: TFGe (mL/min/1,73 m^2) = 0,43 × altura/$creat_{ser}$

Fonte: Adaptado de Hauser AB, 2008; Hauser AB, 2009.

devido à geleificação por estase urinária da glicoproteína Tamm-Horsfall, que normalmente é produzida e secretada pelas células tubulares renais. Os cilindros variam conforme a patologia renal e a gravidade da doença, podendo ser classificados de acordo com o conteúdo do seu interior: hialinos (apenas proteico), granulosos (material amorfo), celulares, hemáticos, hemoglobínicos, leucocitários, céreos e adiposos.

A presença de hemácias no exame de urina é um achado relativamente comum na prática laboratorial, e determinar a sua origem facilita a identificação da origem do sangramento. A avaliação laboratorial da hematúria através da análise da morfologia das hemácias deve ser realizada rotineiramente, sendo que a presença de hemácias dismórficas na urina é um forte indicativo da origem glomerular do sangramento, e uma ferramenta importante no diagnóstico das glomerulonefrites (Figura 9.4). Como as glomerulopatias representam uma doença renal potencialmente progressiva, as ferramentas que aumentem a possibilidade de suspeita diagnóstica são importantes na prevenção da DRC. Os critérios de Birch e Farley consideram dismorfismo hemático a presença de mais de três populações diferentes de células, e quando acima de 80% indicam que a hemorragia é glomerular. A presença de dismorfismo associada à presença dos cilindros foi estudada por Ito *et al.*, 2011, que sugerem uma técnica de concentração para aumentar a sensibilidade do exame de urina no que se refere à pesquisa dos cilindros hemáticos. A determinação de apenas um cilindro hemático é suficiente para indicar a origem glomerular da hematúria.

Microalbuminúria e relação albumina/creatinina

Apesar de o exame laboratorial de microalbuminúria ser considerado um marcador precoce de dano renal, muitas vezes a solicitação da sua dosagem se dá apenas quando há suspeita clínica. A microalbuminúria (albuminúria) constitui um fator preditor da presença de nefropatia e, se persistente, dependendo da intensidade e da duração, é sinal de evolução para DRC. O termo microalbuminúria vem sendo questionado, pois não se trata de molécula pequena de albumina, e sim de detecção de quantidades pequenas de albumina em urina. Uma das aplicações mais importantes desse exame é a pesquisa de doença renal incipiente em pacientes com *diabetes mellitus*, visto que cerca de 20% a 40% desses pacientes vêm a desenvolver nefropatia por perda urinária progressiva de albumina e pela redução da depuração da creatinina. O surgimento de albumina na urina se dá inicialmente na forma de microalbuminúria (30 a 300 mg/24h), pode evoluir progressivamente como macroalbuminúria (> 300 mg/24h) até atingir uma situação conhecida como síndrome nefrótica, na qual se tem proteinúria maciça com consequente hipoalbuminemia. Decorrente disso, ocorre uma resposta hepática com hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, que leva à eliminação de lipídios pelos rins. O parcial de urina característico apresenta lipidúria (gotículas de gordura), cilindros céreos e graxos, e podem aparecer cristais na forma de placas de colesterol.

O exame de microalbuminúria pode ser realizado em urina de 24 horas ou em amostra isolada (Quadro 9.4). Como a diluição da amostra pode sofrer variações, recomenda-se que seja realizada a correção do resultado da albumina (mg) em relação à dosagem de creatinina (g) na mesma amostra de urina, e calcula-se a relação Albumina/Creatinina (A/C). Estudos mostram que a dosagem de albumina na urina e a relação A/C foram capazes de prever satisfatoriamente microalbuminúria de 24 horas.

Outros biomarcadores endógenos

A cistatina C é uma proteína não glicada, de baixo peso molecular (13kDa), sintetizada por todas as células nucleadas e presente em vários líquidos biológicos como soro, líquido seminal e líquido cefalorraquidiano. Como é produzida de

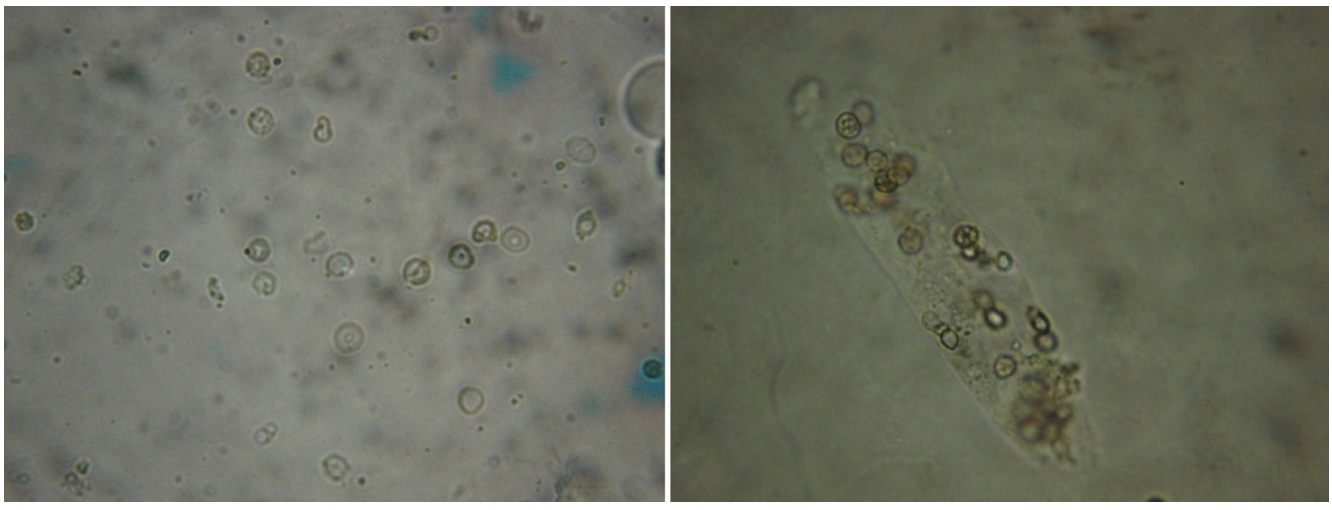


Figura 9.4 Hemácias dismórficas e cilindro hemático em amostra de urina.
Fonte: Ito *et al.*, 2011.

Quadro 9.4 Classificação da excreção urinária a partir da microalbuminúria e da relação A/C.

	Microalbuminúria (urina 24h em mg/24h)	Relação A/C (mg/g)	
Normal	< 15	M < 10	F < 15
Elevado	15 a < 30	M 10 a < 20	F 15 a < 30
Microalbuminúria	30 a < 300	M 20 a < 200	F 30 a < 300
Macroalbuminúria	> 300	M > 200	F > 300

Legenda M = masculino e F = feminino.

Fonte: Gansevoort, *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2005; de Jong, Curhan, 2006.

forma constante, serve como marcador endógeno para avaliar a TFG, sendo considerado um parâmetro sensível e específico. A cistatina C apresenta como vantagens não ser influenciada por drogas, processos inflamatórios ou outros fatores, ser independente da coleta de urina, e necessitar apenas de uma amostra de soro ou plasma. Laboratorialmente, a sua dosagem é realizada por imunoensaio nefelométrico. A desvantagem é o custo elevado da dosagem e a falta de publicações suficientes sobre a utilidade da cistatina C sérica em algumas condições, inclusive na DRC.

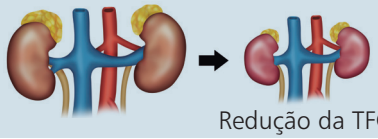
Existem, ainda, outros marcadores endógenos, como a β-2-microglobulina sérica, que apresenta como vantagem a concentração sérica independente de massa muscular e de gênero, mas apresenta níveis elevados em outras patologias não renais, ou seja, parece não apresentar especificidade adequada para o seu uso como biomarcador.

Ureia e relação ureia/creatinina

Após a degradação de aminoácidos ocorre a liberação de amônia, que é extremamente tóxica e é rapidamente convertida em ureia pelo fígado. A ureia é metabólito nitrogenado e produto de excreção menos tóxico do que a amônia. Cerca de 90% da ureia é excretada pelos rins, e o restante é eliminado pelo trato gastrointestinal e pela pele.

Apesar do seu uso tradicional devido à facilidade técnica de dosagem, apresenta várias limitações como biomarcador isolado da função renal. Dentre as desvantagens encontram-se: baixa precisão para o seu uso na estimativa da TFG, não é produzida em ritmo constante, sofre reabsorção tubular, e apresenta nível sérico dependente da alimentação e do catabolismo proteico. Apesar disso, a relação sérica entre Ureia/Creatinina (VR 25-42) auxilia na diferenciação entre elevações da ureia por causa renal, pré-renal ou pós-renal (Quadro 9.5).

Quadro 9.5 Uremia renal, pré-renal ou pós-renal levando em conta a relação U/C.

Uremia pré-renal	$\frac{U(\uparrow)}{Crea\ (\sim N)}$ Valor > 42	Metabolismo excessivo das proteínas, perfusão glomerular reduzida (desidratação, choque hipovolêmico, insuficiência cardíaca congestiva), reabsorção de proteínas após hemorragia gastrointestinal
Uremia renal	$\frac{U}{Crea\ (\uparrow)}$ Valor entre 25 e 42	Rim saudável  Redução da TFG (DRC)
Uremia pós-renal	$\frac{U}{Crea\ (\uparrow)}$ Valor entre 25 e 42	Obstrução renal por nefrolitíase ou por hipertrofia (ex.: tumor da próstata)
Outras situações	$\frac{U(\downarrow)}{Crea}$ Valor < 25	Dieta pobre em proteínas, jejum prolongado, doença hepática ou DRC após diálises repetidas (a ureia é mais difusível que a creatinina).

Fonte: Adaptado de Hauser AB, 2008; Hauser AB, 2009.

Uso de marcadores exógenos

Existem marcadores exógenos que podem ser utilizados para determinar a TFG, ou seja, avaliam a capacidade dos rins em depurar uma determinada substância introduzida no organismo, considerados como padrão-ouro e determinam a TFG real. De forma geral, não são rotineiramente utilizados, pois as complicações decorrentes da sua utilização são inúmeras, tais como: infusão endovenosa contínua do marcador, reações de hipersensibilidade, dosagem laboratorial complexa e trabalhosa, alto custo e dificuldade na padronização da metodologia (Quadro 9.6)

BIOMARCADORES NA DRC EM ESTÁGIOS AVANÇADOS

Com a redução da TFG na DRC em estágios avançados pode ocorrer uma série de situações relacionadas entre si, que envolvem diretamente falhas na função renal:

1. Redução da filtração renal com retenção de toxinas como ureia e creatinina (estado urêmico).
2. Perda do equilíbrio acidobásico com retenção de H^+ associado a uma incapacidade em reabsorver HCO3- (acidose metabólica).
3. Perda do equilíbrio hídrico, com consequente alteração no débito urinário e deficiência na homeostase renal (retenção de sódio e fósforo), que levam à hipertensão (HAS) e hiperfosfatemia.
4. Perda da função endócrina: reduz a síntese de eritropoietina (anemia) e reduz a conversão da vitamina D (hipocalcemia). Como consequência ocorre aumento do paratormônio (PTH), que leva a um hiperparatireoidismo secundário (reabsorção óssea e retenção de fósforo).

O paciente com DRC que se encontra em estágio mais avançado ou mesmo em estágio terminal (diálise) realiza rotineiramente uma série de exames laboratoriais, tais como: hemograma, parcial de urina, dosagem de ureia, creatinina, cálcio, fósforo, magnésio e outros eletrólitos, proteína C-reativa de alta sensibilidade (PCRas), paratormônio (PTH), hormônio estimulante da tireoide (TSH) e outros. Tais exames servem para controlar e monitorar a eficácia da diálise e prevenir as complicações decorrentes da redução da função renal. Os níveis de PCRas possibilitam detecção precoce de DCV e permitem a classificação em risco baixo (< 1 mg/L), médio (1 a 3 mg/L) e alto (> 3 mg/L) para o desenvolvimento de aterosclerose, fato este importante nos pacientes com DRC.

A uremia e suas substâncias acumuladas como ureia, creatinina, produto final de glicação avançado (AGE), e outras toxinas que apresentam potencial pro-inflamatório levam os pacientes com DRC em estágio avançado a um "estado inflamatório sistêmico". Os mecanismos envolvidos na ativação crônica do sistema imune estão intimamente ligados a várias complicações da DRC, como: aterosclerose acelerada, calcificação vascular, resistência à insulina, aumento do catabolismo muscular, perda de apetite, remodelação óssea e aumento da permeabilidade da membrana peritoneal, que representam importantes indicadores de mortalidade por DCV e doenças infecciosas (Figura 9.5). Apesar dos recentes avanços em terapias substitutivas da função renal e dos estudos atuais sobre a fisiopatologia da DRC, a taxa anual de mortalidade dos pacientes em diálise continua extremamente alta. E, mesmo após estratificação por co-morbidades, representam dez a vinte vezes o risco descrito na população geral. Embora a associação entre DRC e risco cardiovascular tenha sido descrita inicialmente nos pacientes em estágio 5, provavelmente o desenvolvimento da DCV começa nas fases iniciais da doença renal. A identificação de fatores associados à inflamação e seus mecanismos de ativação representam um desafio importante na área de doenças renais.

Existem estudos que mostram que a redução da função renal pode estar associada com a resposta inflamatória, com o aumento da concentração plasmática de citocinas proinflamatórias e outros biomarcadores de inflamação, observados tanto em estágios precoces quanto em estágios avançados de disfunção renal. Assim, as Interleucinas (IL1, IL6), Fator de Necrose Tumoral α (TNFα), PCRas, e outros, são importantes biomarcadores de risco para o desenvolvimento das com-

Quadro 9.6 Principais marcadores exógenos e suas características.

Marcador exógeno	Características principais
Inulina	Polímero da frutose (p.m. 5.200 dáltons). Considerado padrão-ouro para a medida da TFG. Marcador exógeno de difícil obtenção para infusão humana
Substâncias radioativas: Cr^{51}-EDTA e TCm-DTPA	Não recomendado, apesar de considerado método com alto grau de correlação com a inulina, envolve isótopos radioativos e necessitam de licença especial (expõe paciente e pessoal técnico, além de gerar lixo radioativo)
Contrastes radiológicos não radioativos: Iotalamato (contraste iônico) e Iohexol (não iônico)	Os contrastes são livremente filtrados pelo glomérulo, não são reabsorvidos nem secretados, e apresentam boa correlação com a inulina. Quando usados para determinar TFG podem ser aplicados em injeção única ou com menor frequência de infusão contínua, mas exigem coletas de várias amostras de sangue e apresentam custo elevado.

Fonte: Frennby *et al*., 1995; Perrone *et al*., 1990; Gaspari, Perico e Remuzzi, 1998.

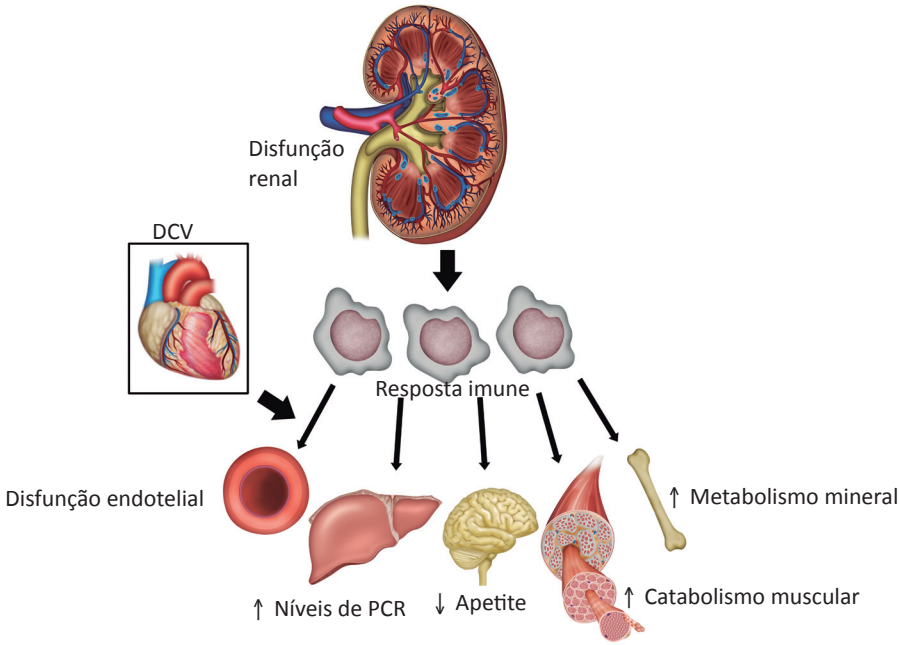


Figura 9.5 Complicações decorrentes da redução da função renal em estágios avançados.
Fonte: Adaptada pela autora de *slide* cedido por Pecoits-Filho, 2009.

plicações citadas anteriormente. Os pacientes com DRC que manifestam persistentes níveis de marcadores inflamatórios encontram risco ainda mais elevado de desenvolver DCV, e os sinais de atividade inflamatória observados nas fases iniciais da DRC associados aos níveis elevados dos biomarcadores inflamatórios estão relacionados com baixa sobrevida desses pacientes.

INJÚRIA RENAL AGUDA

A Injúria Renal Aguda (IRA) é caracterizada pela redução abrupta da função renal em um curto período de tempo. É considerada uma síndrome associada a diversos fatores etiológicos, com variadas manifestações clínicas. Essa patologia tem etiologia multifatorial, sendo consequência de fatores como choque séptico, hipovolemia, drogas nefrotóxicas, insuficiência cardíaca e uso de contrastes para exames de imagem. Além disso, outros fatores de risco são importantes no desenvolvimento da IRA, tais como: idade avançada, doenças hepáticas, nefropatia preexistente e diabetes O modelo conceitual de IRA identifica quatro componentes: risco (RIM normal e risco aumentado); fase intermédia (lesão funcional); IRA (diminuiu filtração glomerular e insuficiência renal); e desfechos (insuficiência renal e morte).

Na IRA ocorre a diminuição da TFG, com consequente retenção sérica de produtos nitrogenados como ureia e creatinina, e redução do volume urinário para menos que 400 mL por dia. O termo abrange alterações renais que incluem desde elevação mínima na creatinina sérica até falência renal e anúria. Em 2004 o grupo Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) publicou a classificação de RIFLE *Risk-Injury-Failure-Loss--End Stage Renal Disease*. Essa classificação define três classes de gravidade da IRA (risco, lesão e falência) baseadas em três critérios: aumento relativo da creatinina sérica, queda da TFG, e diminuição do fluxo urinário. Em 2007 surgiu a classificação de AKIN, que leva em conta o aumento no valor absoluto da creatinina sérica de 0,3 mg/dL, em relação ao valor de referência como critério diagnóstico; e os termos risco, lesão, e falência foram substituídos por Estádios 1, 2 e 3, respectivamente, e o tempo para diagnóstico passou de sete dias para 48 horas. Apesar do avanço no conhecimento epidemiológico da IRA proporcionado pelo uso das classificações de RIFLE e AKIN, os critérios utilizados por essas classificações ainda são falhos. Muitas características não diretamente associadas à função renal, tais como: idade, taxa de catabolismo, uso de drogas, massa muscular e raça influenciam o nível dos marcadores atualmente utilizados para avaliação de função e lesão renal.

Creatinina e ureia séricas

Assim como na DRC, apesar de a creatinina ser o biomarcador mais utilizado para avaliação da função renal, não reflete de forma fidedigna a TFG. Na IRA ocorre um estado de desequilíbrio (*non-steady*), em que os três determinantes da concentração de creatinina no soro (produção, volume de distribuição e eliminação renal) flutuam, determinando um atraso ainda maior na elevação da creatinina em relação à queda da TFG. A Figura 9.6 mostra que após queda brusca da TFG há um atraso de dias para a elevação da creatinina, assim como após o início da recuperação da TFG a queda da creatinina também é tardia.

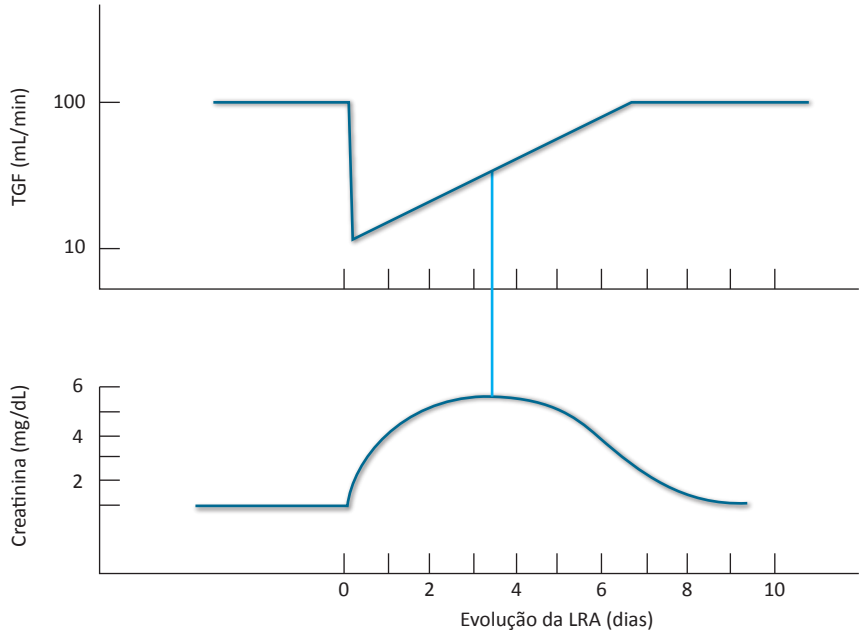


Figura 9.6 Taxa de filtração glomerular e creatinina sérica em pacientes com IRA.
Fonte: Adaptada de Moran e Myers, 1985.

Em relação à ureia, da mesma forma que para a DRC, sua dosagem isolada não serve para determinar a TFG. Mas a relação sérica entre Ureia/Creatinina (U/C) conforme citado anteriormente (ver Quadro 9.5), pode ser útil, particularmente quando se avaliam pacientes com quedas abruptas da TFG, como é o caso da IRA. Em condições de diminuição do volume efetivo intravascular e insuficiência cardíaca descompensada, aumentos da ureia não são proporcionais ao aumento no nível de creatinina e da queda na TFG. Assim como elevações da ureia, independentemente dos níveis séricos de creatinina, são consequência de processo patológico distinto.

Biomarcadores precoces

Tanto na lesão renal aguda, como em outras situações clínicas, o beneficio da terapêutica está diretamente associado a um diagnóstico precoce. Baseada na creatinina sérica, o diagnóstico da IRA ocorre somente na fase da diminuição da TFG e aumento da creatinina sérica. Considerando que a lesão renal tem inicio mais precoce, as intervenções baseadas no diagnóstico pela creatinina sérica serão sempre tardias. A utilização dos biomarcadores precoces da IRA é importante para a identificação da lesão antes do decréscimo na TFG.

Atualmente existem estudos, por meio de análise proteômica, para determinar o perfil de diferentes proteínas envolvidas na fase inicial ou funcional de lesões renais isquêmicas e nefrotóxicas. Tais biomarcadores também podem ser úteis para prever o curso da IRA e possivelmente prever o prognóstico. A capacidade para detecção de injúria renal está diretamente associada com a fisiopatologia desses biomarcadores. Diferentes mecanismos determinam seu aparecimento na urina. A lesão de células tubulares induz o escape de enzimas e microproteínas para a luz tubular, e a magnitude da elevação dos biomarcadores na urina vai depender da natureza do insulto e da gravidade da lesão das células tubulares. Os principais locais relacionados à liberação desses biomarcadores são: citoplasma, lisossoma ou membrana. Outro mecanismo para o aparecimento desses biomarcadores na urina é a diminuição da reabsorção de proteínas de baixo peso molecular que normalmente são filtradas no glomérulo e reabsorvidas totalmente pelas células tubulares proximais. A origem estrutural do biomarcador (citoplasmática, lisossômica ou membranosa) fornece a informação da natureza da lesão celular.

Lipocalina Associada com Gelatinase de Neutrófilos Humanos (NGAL)

O NGAL é uma proteína de 25-kD, caracterizada em neutrófilos e ligada a gelatinase por ligações covalentes. A função fisiológica de NGAL nos rins é desconhecida, mas acredita-se que tenha um papel na morfogênese renal. Esta lipocalina é expressa em baixas concentrações em diferentes tecidos, incluindo o rim, pulmão e trato gastrointestinal. É filtrada livremente no glomérulo e reabsorvida no túbulo proximal, posteriormente é liberada nos túbulos distais e secretada com a urina.

A análise proteômica de estudos utilizando modelo animal revelou o NGAL como a proteína mais precocemente e

com maior produção após insulto renal isquêmico ou nefrotóxicos. Vários estudos clínicos têm sugerido que a expressão de NGAL na urina pode servir como marcador precoce de IRA. De todos os novos biomarcadores, o NGAL é o mais conhecido, sendo disponível comercialmente em kits de imunoensaio turbidimétrico para a determinação quantitativa de NGAL em amostras de urina e plasma (EDTA ou heparina). Em condições normais, os níveis de NGAL são muito baixos em urina, mas em resposta à injúria renal, efeitos nefrotóxicos, sepse e demais alterações crônicas progressivas, a síntese desta substância aumenta, há redução na reabsorção e, com isso, os níveis aumentam dentro de trinta minutos após o evento danoso, precedendo o aparecimento de outros biomarcadores como a creatinina.

KIM-1 Kidney Injury Molecule-1

O biomarcador KIM-1 é uma glicoproteína (90 kDa) transmembrana do tipo I com um domínio externo clivável localizado na membrana apical de túbulos com lesão aguda e crônica. Estudos mostram que o KIM-1 desempenhe um papel nos processos de regeneração após lesão epitelial. Normalmente é indetectável no tecido renal normal, mas apresenta expressão muito elevada em células epiteliais do túbulo proximal após lesão isquêmica ou tóxica. Pode ser detectado na urina de paciente com necrose tubular aguda (NTA) e pode vir a servir como um biomarcador útil para lesão tubular proximal, possivelmente possibilitando o diagnóstico precoce e discriminar entre as diversas formas de IRA.

Interleucina 18

A interleucina 18 (IL-18) é uma citocina pró-inflamatória de aproximadamente 24kDa, gerado pela clivagem da caspase-1.51 que induz a síntese e liberação de interferon gamma, e outras citocinas inflamatórias como IL-8, 4 e 13, e fator de necrose tumoral. É considerado um bom candidato a marcador precoce de IRA, pois modula a ação de várias células imunologicamente ativas: macrófagos, monócitos, linfócitos e granulocitos, e apresenta a capacidade de induzir apoptose. Estudos mostram pacientes com NTA apresentaram níveis significativamente mais elevados de IL-18 urinários em relação aos de controles e pacientes com outras formas de doença renal. Do mesmo modo, os pacientes que foram submetidos a transplante renal e tiveram função retardada do enxerto tinham níveis mais elevados de IL-18 urinários que pacientes sem retardo da função de enxerto.

N-acetil-B-D-glucosaminidase (NAG)

O NAG é uma enzima lisossomal (> 130 kDa) presente em várias células, incluindo os túbulos renais. Devido a seu grande peso molecular, não é filtrada, implicando que elevações urinárias são de origem tubular. Seu aumento sugere lesão de células tubulares ou pode refletir o aumento da atividade de lisossomos. De todos os biomarcadores precoces de IRA, este parece ser o menos utilizado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tema abordado é de extrema importância, sendo que dentre as patologias renais, destaca-se a DRC como importante problema de saúde pública. Atualmente, a DRC está presente em cerca de 5% a 10% da população mundial e a incidência tem aumentado, inclusive no Brasil, devido ao número crescente de pacientes portadores de diabetes mellitus, hipertensão arterial, bem como pelo aumento da longevidade da população.

Os exames laboratoriais de rotina são importantes para o diagnóstico precoce e evitar que o paciente progrida para estágios mais avançados até atingir estágio terminal, sendo necessária terapia substitutiva da função renal. Destacam-se os biomarcadores laboratoriais, comentados neste capítulo, como importantes indicadores quantitativos de processos patológicos e, que são empregados para fins de diagnóstico ou de monitoração da terapêutica. Assim, como também é importante ter conhecimento sobre as limitações do uso destes biomarcadores.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Abensur Hea. Biomarcadores na Nefrologia. [Internet] [Acesso em 30 mar 2017]. Disponível em: www.sbn.org.br
2. Barros E, Manfro RC, Thomé FS, et al. Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento. Porto Alegre: Artmed, 2006.
3. Birch DF, Fairley KF. Haematuria: glomerular or non-glomerular? Lancet. 1979;2(8147):845-6.
4. Birch, D.F.; Fairley, K.F.; Becker, G.J.; Kincaid-Smith P. A Color Atlas of Urine Microscopy. London: Chapman & Hall Medical, 1ed. 2001.
5. Burtis CAA, E.R. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 5.ed. Philadelphia, 2012. p.836.
6. Cauthen CA, Lipinski MJ, Abbate A, et al. Relation of blood urea nitrogen to long-term mortality in patients with heart failure. Am J Cardiol. 2008;101(11):1643-7.
7. Censo 2011. [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: www.sbn.org.br
8. Cruz DN, Ronco C. Acute kidney injury in the intensive care unit: current trends in incidence and outcome. Crit Care. 2007;11(4):149.
9. de Jong PE, Curhan GC. Screening, monitoring, and treatment of albuminuria: Public health perspectives. J Am Soc Nephrol. 2006;17(8):2120-6.
10. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. J Am Soc Nephrol. 2006;17(6):1503-20.
11. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. Am J Kidney Dis. 1998;32(5 Suppl 3):S112-9.
12. Frennby B, Sterner G, Almen T, et al. The use of iohexol clearance to determine GFR in patients with severe chronic renal failure--a comparison between different clearance techniques. Clin Nephrol. 1995;43(1):35-46.
13. Gansevoort RT, Verhave JC, Hillege HL, et al. The validity of screening based on spot morning urine samples to detect subjects with microalbuminuria in the general population. Kidney Int Suppl. 2005(94):S28-35.
14. Gaspari F, Perico N, Remuzzi G. Application of newer clearance techniques for the determination of glomerular filtration rate. Curr Opin Nephrol Hypertens. 1998;7(6):675-80.

15. Gault MH, Longerich LL, Harnett JD, et al. Predicting glomerular function from adjusted serum creatinine. Nephron. 1992;62(3):249-56.
16. Grubb A, Nyman U, Bjork J, et al. Simple cystatin C-based prediction equations for glomerular filtration rate compared with the modification of diet in renal disease prediction equation for adults and the Schwartz and the Counahan--Barratt prediction equations for children. Clin Chem. 2005;51(8):1420-31.
17. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, et al. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. Am J Kidney Dis. 2009;54(6):1012-24.
18. Hauser AB, Stinghen AE, Kato S, et al. Characteristics and causes of immune dysfunction related to uremia and dialysis. Perit Dial Int. 2008;28 Suppl 3:S183-7.
19. Hauser AB. Avaliação do impacto do carbonato de sevelamer nos níveis circulantes de endotoxinas e do fator de necrose tumoral alfa em um modelo experimental de insuficiência renal. 90f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2009.
20. Hewitt SM, Dear J, Star RA. Discovery of protein biomarkers for renal diseases. J Am Soc Nephrol. 2004;15(7):1677-89.
21. Ito CA, Pecoits-Filho R, Bail L, et al. Comparative analysis of two methodologies for the identification of urinary red blood cell casts. J Bras Nefrol. 2011;33(4):402-7.
22. K/DOQI. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease. Am J Kidney Dis. 2002;39(Suppl 1):S1-S246.
23. KDIGO (Kidney Disease Improving global Outcomes) 2012. Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Official Journal of the International Society of Nephrology, 2013. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf
24. Khan DA, Ahmad TM, Qureshil AH, et al. Assessment of proteinuria by using protein: creatinine index in random urine sample. J Park Med Assoc. 2005;55(10):428-31.
25. Larsson A, Malm J, Grubb A, et al. Calculation of glomerular filtration rate expressed in mL/min from plasma cystatin C values in mg/L. Scand J Clin Lab Invest. 2004;64(1):25-30.
26. Leslie JA, Meldrum KK. The role of interleukin-18 in renal injury. J Surg Res. 2008;145(1):170-5.
27. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. Ann Intern Med. 2009;150(9):604-12.
28. Liano F, Junco E, Pascual J, et al. The spectrum of acute renal failure in the intensive care unit compared with that seen in other settings. The Madrid Acute Renal Failure Study Group. Kidney Int Suppl. 1998;66:S16-24.
29. Macedo E, Bouchard J, Soroko SH, et al. Fluid accumulation, recognition and staging of acute kidney injury in critically-ill patients. Crit Care. 2010;14(3):R82.
30. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. Crit Care. 2007;11(2):R31.
31. Mishra J, Ma Q, Kelly C, et al. Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation. Pediatr Nephrol. 2006;21(6):856-63.
32. Moran SM, Myers BD. Course of acute renal failure studied by a model of creatinine kinetics. Kidney Int. 1985;27(6):928-37.
33. Newman DJ, Thakkar H, Edwards RG, et al. Serum cystatin C measured by automated immunoassay: a more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. Kidney Int. 1995;47(1):312-8.
34. Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, et al. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. Ann Intern Med. 2008;148(11):810-9.
35. Pecoits-Filho R, Heimburger O, Barany P, et al. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. Am J Kidney Dis. 2003;41(6):1212-8.
36. Pecoits-Filho R. Diagnóstico de Doença Renal Crônica: Avaliação da Função Renal. J Bras Nefrol. 2004;26(3):4-5.
37. Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. Clin Chem. 1992;38(10):1933-53.
38. Perrone RD, Steinman TI, Beck GJ, et al. Utility of radioisotopic filtration markers in chronic renal insufficiency: simultaneous comparison of 125I-iothalamate, 169Yb-DTPA, 99mTc-DTPA, and inulin. The Modification of Diet in Renal Disease Study. Am J Kidney Dis. 1990;16(3):224-35.
39. Riella MC. Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrolíticos. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
40. Ritz E, Rychlik I, Locatelli F, et al. End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions. Am J Kidney Dis. 1999;34(5):795-808.
41. Rizzoni G, Braggion F, Zacchello G. ["Glomerular" and "non--glomerular" hematurias. Importance of study of the morphology of the urinary red globuli]. Minerva Nefrol. 1983;30(1):11-7.
42. Rizzoni G, Braggion F, Zacchello G. Evaluation of glomerular and nonglomerular hematuria by phase-contrast microscopy. J Pediatr. 1983;103(3):370-4.
43. Romão JE. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. J Bras Nefrol. 2004;26(3s1):26-31.
44. Ronson D, Mittleman MA, Burger AJ. Elevated blood urea nitrogen level as a predictor of mortality in patients admitted for decompensated heart failure. Am J Med. 2004;116(7):466-73.
45. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. Circulation. 2003;108(17):2154-69.
46. Schrier RW. Blood urea nitrogen and serum creatinine: not married in heart failure. Circ Heart Fail. 2008;1(1):2-5.
47. Shlipak MG, Fried LF, Crump C, et al. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. Circulation. 2003;107(1):87-92.
48. Simonsen O, Grubb A, Thysell H. The blood serum concentration of cystatin C (gamma-trace) as a measure of the glomerular filtration rate. Scand J Clin Lab Invest. 1985;45(2):97-101.
49. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson R, et al. IL-10, IL-6 and TNF--a as central factors in the altered cytokine network of ESRD - the good, the bad and the ugly. Kidney Int. 2005;67(4):1216-33
50. Stenvinkel P. Interactions between inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction in end-stage renal disease. J Ren Nutr. 2003;13(2):144-8.

51. Strasinger SK. Uroanálise e Fluidos Biológicos. 5.ed. São Paulo: LMP, 2009.
52. UPDATE KDOQI Clinical Practice Guideline for Diabetes and CKD. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines_commentaries.cfm
53. Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, et al. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. Am J Physiol Renal Physiol. 2006;290(2):F517-29.
54. van Timmeren MM, Bakker SJ, Vaidya VS, et al. Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy. Am J Physiol Renal Physiol. 2006;291(2):F456-64.
55. Vincent JL. Incidence of acute renal failure in the intensive care unit. Contrib Nephrol. 2001(132):1-6.

10

capítulo

Fabiane Gomes de Moraes Rego

Endocrinologia Clínica e Diagnóstica

INTRODUÇÃO

Endocrinologia é o estudo dos hormônios e suas ações. A origem da palavra hormônio é grega, *hormôn*, que significa estímulo, movimento. Foi o fisiologista Ernest Starling quem identificou as substâncias denominadas hormônios, em 1905. Hormônio é uma substância química produzida no corpo por um órgão, por células de um órgão ou células difusas, que possuem efeito regulatório na atividade de um órgão ou órgãos.

Virtualmente, todos os processos que ocorrem nos organismos superiores são regulados por um ou mais hormônios: manutenção da pressão arterial, do volume sanguíneo e do equilíbrio eletrolítico; embriogênese, desenvolvimento, diferenciação sexual e reprodução, fome, comportamento alimentar, digestão e alocação de energia, para mencionar apenas alguns. Os sinais hormonais integram e coordenam as atividades metabólicas de diferentes tecidos e aperfeiçoam o fornecimento de combustíveis e precursores para cada órgão.

Distúrbios endócrinos podem resultar de disfunção originária da glândula endócrina periférica propriamente dita (desordens primárias) ou a partir da estimulação diminuída ou excessiva por desordens pituitárias (secundárias). Os distúrbios podem resultar em superprodução de hormônio (hiperfunção) ou subprodução (hipofunção). Raramente, desordens endócrinas (em geral hipofunção) ocorrem devido a respostas dos tecidos anormais aos hormônios.

Os sintomas de distúrbios endócrinos podem ser inespecíficos devido ao número de sistemas que são afetados pela ação hormonal, e iniciar de forma insidiosa, fazendo com que o reconhecimento clínico seja frequentemente adiado por meses ou anos. Além disso, muitas glândulas endócrinas são relativamente inacessíveis ao exame físico direto. Por esta razão, o diagnóstico laboratorial é essencial, e normalmente requer a quantificação das concentrações plasmáticas do hormônio endócrino periférico, do hormônio pituitário, ou de ambos.

CONTROLE DA SECREÇÃO HORMONAL

A produção hormonal não é uniforme e contínua, mas um processo dinâmico no qual as concentrações circulantes dos hormônios são mantidas dentro dos limites fisiológicos. A secreção hormonal é induzida por múltiplos sinais específicos, bioquímicos e neurais. Entre os fatores que controlam a secreção hormonal encontram-se:

- **Agentes estimuladores:** Tais como peptídios hipotalâmicos, neurotransmissores, hormônios trópicos e medicamentos podem influenciar a síntese e a liberação dos hormônios.
- **Agentes inibitórios:** Hormônios sintetizados pelas células do órgão-alvo bem como a mudança nos produtos metabólicos como resultado da ação hormonal podem controlar as glândulas endócrinas por retroalimentação. Drogas que são utilizadas nos testes de supressão, como a dexametasona, que é um análogo sintético do cortisol e é usada para suprimir a produção pituitária do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), e, logo, de cortisol no diagnóstico diferencial da síndrome de Cushing.
- **Estresse:** Pode aumentar a síntese e a liberação de hormônios. A secreção do hormônio do crescimento (GH), de prolactina, de ACTH e, consequentemente, do cortisol pode ser estimulada por estados de estresse físico ou emocional.
- **Biorritmo:** Um biorritmo é uma ocorrência cíclica de um evento fisiológico. A secreção rítmica de hormônios é uma importante característica regulatória da maioria dos sistemas endócrinos. Esse ritmo pode variar de minutos a horas, dias, semanas ou mesmo por períodos maiores. Ritmos com um intervalo de aproximadamente 24 horas são denominados circadianos ou diurnos, os quais são regulados por um ou mais relógios internos, usualmente sincronizados com situações ambientais, como ciclo dia/noite e sono. Biorritmos que acorrem mais frequentemente que uma vez ao dia são referidos como ritmos ultradianos, enquanto os ritmos infradianos têm períodos maiores que 24 horas, tais como o ciclo menstrual ou ritmos periódicos. A marcada reprodutibilidade dos ritmos endócrinos e sua liberação e a relativa facilidade de dosagem resultam em seu frequente uso nos laboratórios. Amostras obtidas em horas apropriadas do dia ou da noite fornecem um indicador dinâmico útil da função endócrina. Por exemplo, perda do ritmo diurno da secreção

de cortisol serve como teste de triagem diagnóstica para síndrome de Cushing. Certos tratamentos são altamente tempo-dependentes em termos de sua eficiência. Por exemplo, o tempo ótimo para administração de glicocorticoides para suprimir a secreção do ACTH em pacientes com hiperplasia congênita da adrenal.

O hipotálamo (uma pequena região do cérebro) e a glândula pituitária anterior ocupam posição central no controle da secreção de hormônios. Em resposta a mensagens do sistema nervoso central (SNC), o hipotálamo produz um número de hormônios neurossecretores: hormônio liberador de tireotropina (TRH), hormônio liberador de corticotropina (CRH), hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), hormônio liberador de hormônio de crescimento (GHRH), a somatostatina e a dopamina. Esses fatores de liberação passam diretamente para a pituitária através de vasos sanguíneos especiais e neurônios que conectam as duas glândulas. Os hormônios hipotalâmicos estimulam a síntese e a secreção dos hormônios tróficos: tireotropina (TSH), adrenocorticotrópico (ACTH), luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH), hormônio do crescimento (GH). Em contraste, a somatostatina suprime a secreção de GH, TRH, TSH CRH e ACTH e a dopamina suprime a secreção da prolactina. Contudo, o efeito da somatostatina na regulação do eixo adrenal cortical e tireoidiano normalmente é pequeno. Esses hormônios tróficos, por sua vez, regulam outras glândulas endócrinas alvos (córtex da adrenal, tireoide, ovários e testículos), que por sua vez secretam seus hormônios específicos, que são carreados na circulação sanguínea até seus tecidos-alvo. Como exemplo, o hormônio hipotalâmico CRH estimula a pituitária anterior a liberar ACTH, que atravessa a zona fasciculada do córtex adrenal e estimula a liberação de cortisol. Cortisol, o último hormônio dessa cascata, atua através de seus receptores e muitos tecidos-alvo para alterar seu metabolismo. Nos hepatócitos, um dos efeitos do cortisol é aumentar a gliconeogênese. Cascatas hormonais como esta resultam em grande amplificação do sinal inicial e permitem um refinado controle do último hormônio. Em cada nível da cascata, um pequeno sinal desencadeia grande resposta. Por exemplo, o sinal elétrico inicial para o hipotálamo resulta na liberação de poucas nanogramas de CRH, o qual estimula liberação de poucos microgramas de ACTH, que atua na adrenal causando liberação de miligramas de cortisol, uma amplificação na ordem de milhões de vezes. Na ausência desses hormônios tróficos, as glândulas-alvo são incapazes de manter as taxas normais de secreção. Os principais órgãos-alvo dos hormônios tróficos pituitários são a tireoide, o córtex da adrenal e as gônadas (Figura 10.1).

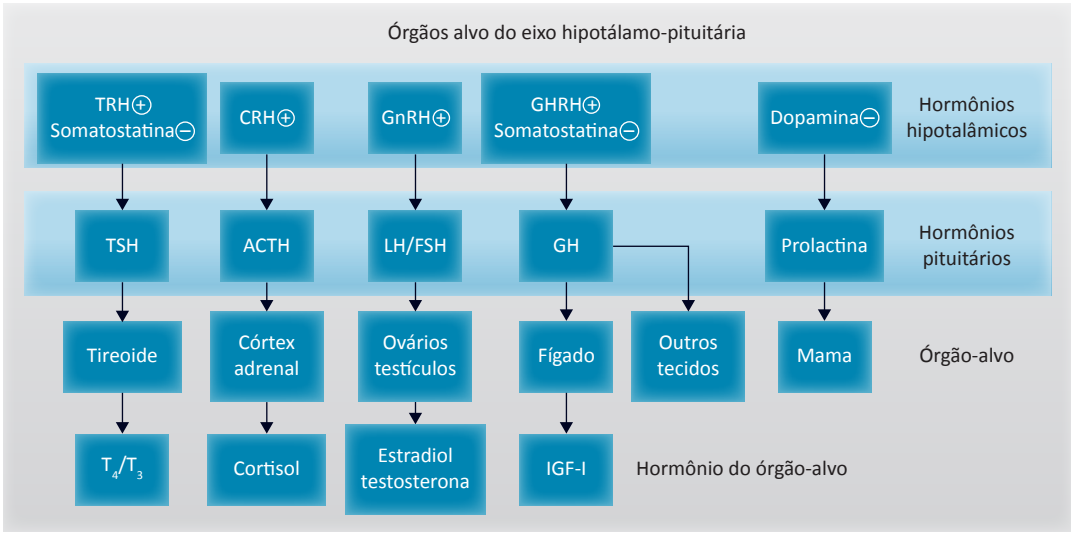


Figura 10.1 Cadeia de comando de sinalização hormonal hierárquica. O hipotálamo, no cérebro, é o centro de coordenação do sistema endócrino, que em resposta a mensagens do sistema nervoso central (SNC) produz fatores regulatórios (fatores de liberação) que estimulam (⊕) ou suprimem (⊖) a síntese e a secreção de hormônios pela pituitária anterior: hormônio liberador de tireotropina (TRH), hormônio liberador de corticotropina (CRH), hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), hormônio liberador de hormônio de crescimento (GHRH), a somatostatina e a dopamina. A pituitária anterior responde aos hormônios hipotalâmicos produzindo hormônios tróficos ou trofinas: tireotropina (TSH), adrenocorticotrópico (ACTH), luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH), hormônio do crescimento (GH). A prolactina é o único hormônio da pituitária anterior cuja regulação é feita predominantemente por supressão. A dopamina suprime a secreção de prolactina e a somatostatina suprime a secreção de GH e TSH. Esses hormônios pituitários ativam o próximo grupo de glândulas endócrinas, que incluem: a tireoide, o córtex da adrenal, os ovários, os testículos, o fígado e a mama. Essas glândulas, por sua vez, são estimuladas a produzir seus hormônios específicos (tireoide: tri-iodotironina (T_3) e a tiroxina (T_4); córtex da adrenal: cortisol; ovários: estradiol; testículos: testosterona; fígado: somatomedinas (IGF-1)), os quais serão careados pela corrente sanguínea para encontrar seus receptores nos tecidos-alvos. Redesenhada de Gaw, *et al.*, 1995.

A produção da maioria dos hormônios é regulada direta ou indiretamente pela atividade metabólica do próprio hormônio. Essa regulação é uma característica distinguível do sistema endócrino e é acompanhada por uma série de mecanismos de controle por retroalimentação. A cada nível de uma cascata hormonal há a possibilidade de uma inibição por retroalimentação dos passos anteriores da cascata. Níveis elevados do último hormônio ou de um dos hormônios intermediários inibem a liberação dos hormônios anteriores da cascata. Esses mecanismos de retroalimentação realizam os mesmos objetivos que os mecanismos que limitam a velocidade de uma via biossintética: um produto é feito (ou liberado) somente até que sua concentração necessária tenha sido alcançada.

O hormônio secretado pela glândula-alvo (adrenal) age a nível hipofisário, diminuindo a secreção do respectivo hormônio trófico (ACTH), que, por sua vez, inibe a secreção hipotalâmica do respectivo neuro-hormônio (CRH), constituindo mecanismo de retroalimentação negativa de alça curta. O hormônio secretado pela glândula-alvo (cortisol) além de inibir a secreção do respectivo hormônio trófico (ACTH), inibe a secreção hipotalâmica do respectivo neuro-hormônio (CRH), constituindo mecanismo de retroalimentação negativa de alça longa. Além disso, seguindo a mesma linha de raciocínio, acredita-se que alguns hormônios pituitários (por exemplo, TSH) possam inibir até mesmo a própria secreção diretamente a nível pituitário, que constitui um mecanismo de retroalimentação negativo de alça ultracurta. Alças de retroalimentação de alça ultracurta também ocorrem quando os hormônios hipotalâmicos inibem sua própria secreção ou estimulem a produção de um fator hipotalâmico inibitório (Figura 10.2).

Quando as concentrações dos hormônios das glândulas-alvo caem, a pituitária percebe o declínio e aumenta a

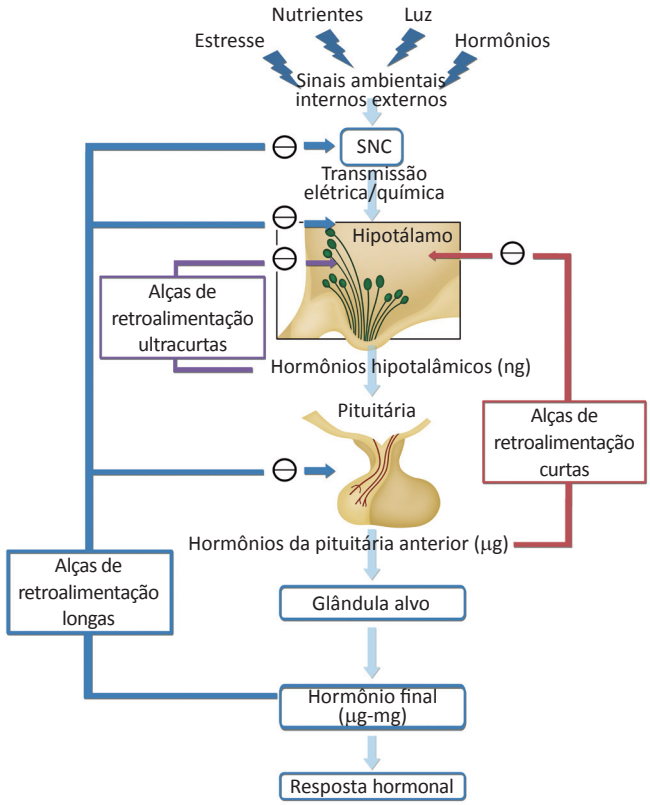


Figura 10.2 Mecanismo de retroalimentação e cascata de liberação hormonal segundo o sensoriamento ambiental pelo SNC para o hipotálamo. Os sinais ambientais são transmitidos pelo sistema nervoso central (SNC) para o hipotálamo, o qual responde com a secreção (nanogramas: ng) de um hormônio liberador específico. Hormônios liberadores são transportados por um sistema porta fechado para a pituitária anterior, onde ligam-se aos seus receptores específicos e causam secreção (micronogramas: µg) de hormônios específicos da pituitária anterior. Estes acessam a circulação geral por meio de capilares locais fenestrados e desencadeiam liberação de um hormônio final (micronogramas: µg a miligramas: mg), que geram sua resposta por ligação a receptores em tecidos-alvos, constituindo um sistema de amplificação de sinal. Consequentemente, o organismo está em íntima associação com o ambiente externo. Os hormônios de glândulas-alvo ou os substratos com origem no metabolismo tecidual por exercer retroalimentação negativa (⊖) de alças longas (setas azuis) tanto sobre a hipófise, o hipotálamo ou o SNC. A retroalimentação negativa (⊖) de alça curta (setas cor de tijolo) pode ser exercida pelos hormônios tróficos pituitários sobre a síntese e secreção dos hormônios hipotalâmicos de liberação ou inibição. Ainda, os hormônios liberadores hipotalâmicos podem inibir sua própria síntese e liberação, constituindo o mecanismo de retroalimentação negativa (⊖) de alça ultracurta (setas roxas). Adaptada de Norman e Litwack, 1997.

produção do hormônio trópico apropriado, que posteriormente entra na circulação e estimula a produção adicional do hormônio da glândula-alvo. Diminuição das concentrações hormônios-alvo também afeta a retroalimentação ao nível do hipotálamo para aumentar a produção e a secreção dos hormônios liberadores e inibitórios que, por sua vez, regulam a secreção dos hormônios pituitários.

Em contraste com a retroalimentação negativa, a retroalimentação positiva raramente opera isoladamente, mas constitui uma parte integral do sistema de controle. Um exemplo de retroalimentação positiva é a estimulação do hormônio luteinizante (LH) liberado por um progressivo aumento nos níveis de estradiol previamente à ovulação.

Contudo, nem todas as células produtoras de hormônios fazem parte de longas cascatas regulatórias. Um dos exemplos mais simples de retroalimentação negativa é o controle da secreção do paratormônio (PTH). A concentração plasmática de cálcio (calcemia) influencia a contração cardíaca e a transmissão nervosa, devendo, portanto, ser mantida dentro de uma faixa estreita de normalidade. Toda vez que a calcemia diminui, as glândulas paratireoide secretam o PTH, capaz de desencadear uma série de mecanismos, a níveis ósseo, renal e intestinal, que levam a um aumento de cálcio plasmático. Esse aumento da calcemia, por sua vez, causa diminuição da secreção de PTH, fazendo com que todo o sistema retorne à normalidade. Outro exemplo é a liberação de insulina pelo pâncreas, largamente regulada pelas concentrações plasmáticas de glicose fornecidas ao pâncreas. Quando a glicose sanguínea se eleva, a glicose é eficientemente transportada pelos transportadores GLUT2 para o interior das células betapancreáticas, imediatamente convertida em glicose-6-fosfato pela glucoquinase, e entra na glicólise. A velocidade aumentada do catabolismo da glicose promove um aumento na concentração de ATP, que causa o fechamento de canais de K^+ controlados pelo ATP na membrana plasmática. A redução do fluxo de saída do K^+ despolariza a membrana (saída de K^+ por um canal aberto de K^+ hiperpolariza a membrana e o fechamento do canal de K^+, portanto, despolariza a membrana), o que faz abrir os canais de cálcio sensíveis à voltagem, presentes na membrana plasmática. A entrada de cálcio através de canais de cálcio na membrana plasmática desencadeia a liberação da insulina por exocitose. Estímulos provenientes do sistema nervoso parassimpático e simpático também estimulam e inibem a liberação de insulina, respectivamente. A concentração plasmática de glicose, o fator mais importante regulado pela insulina, é por si só o fator primário que desencadeia a liberação da insulina. Uma simples alça de retroalimentação limita a liberação do hormônio: estimulando a captação pelos tecidos, a insulina, diminui a glicose sanguínea. A diminuição da concentração de glicose no sangue é detectada pela célula β, pela diminuição do fluxo através da reação da hexoquinase; isso diminui ou bloqueia a liberação de insulina. Essa regulação de retroalimentação mantém quase constante a concentração de glicose no sangue, a despeito das grandes flutuações da sua ingestão.

DOENÇAS ENDÓCRINAS

As doenças endócrinas podem ser classificadas em quatro categorias: deficiência de produção hormonal, excesso de produção hormonal, resposta anormal aos tecidos, e anormalidades endócrinas múltiplas.

Deficiência de produção hormonal

Deficiências de um hormônio em particular são comumente observadas nas situações em que ocorre destruição da estrutura glandular responsável por sua produção. Grande variedade de processos, desde a remoção cirúrgica até a destruição por tuberculose, agentes químicos ou tóxicos, câncer, deposição de ferro ou autoimunes podem destruir a glândula endócrina. A remoção cirúrgica de uma glândula constitui um caso de hipossecreção iatrogênica, por exemplo, no tratamento do hipertiroidismo através da tireoidectomia, podendo resultar em hipoparatireodismo. Insuficiência adrenal pode ser decorrente de tuberculose ou exposição a certos derivados inseticidas, sendo que o último constitui causa rara. Tumores das glândulas endócrinas resultam, com frequência, em excesso de produção hormonal, mas alguns tumores levam à baixa produção hormonal por provocar sintomas compressivos locais ou disseminação metastática. Como exemplos são citados os denominados tumores não funcionais da pituitária, os quais são geralmente benignos, mas podem causar uma variedade de sintomas devidos à compressão das estruturas adjacentes, e o câncer de tireoide, que pode se disseminar pelo corpo sem causar hipertireoidismo. A hemocromatose é uma desordem caracterizada por armazenamento alterado de ferro, o que pode resultar em depósito de ferro nas células betapancreáticas progressivamente, destruindo-as. A destruição autoimune das células betapancreáticas no *Diabetes mellitus* tipo 1 ou a destruição das células tiroidianas na tireoidite de Hashimoto são duas das mais comuns desordens tratadas pelos endocrinologistas. Similarmente, deficiência de precursores apropriados (como por exemplo, a deficiência de iodo levando ao hipotireoidismo) também leva à diminuição da quantidade de hormônio produzida disponível que o organismo requer. Mais raramente, grande número de anormalidades genéticas, que pode resultar na diminuição da produção hormonal. Essas desordens podem provocar o desenvolvimento anormal de uma célula produtora de hormônio (hipogonadismo hipogonadotrófico causado pela mutação do gene *KAL*), da síntese anormal de hormônio (deleção do gene do GH), de regulação anormal da secreção hormonal (hipoparatireoidismo associado às mutações ativadoras dos receptores sensíveis ao cálcio das células paratireoides) ou defeitos na maquinaria enzimática necessária para a produção do hormônio (hiperplasia drenal congênita resultante de mutações, com perda de função de enzimas específicas, que são responsáveis pela síntese de cortisol).

Excesso de produção hormonal

Está associado ao excesso de hormônio e/ou superestimulação dos receptores hormonais. Grande variedade de tu-

mores endócrinos pode produzir hormônios em excesso ou de forma descontrolada. Lembrando que a secreção hormonal por tumores nem sempre está sujeita ao mesmo tipo de regulação por retroalimentação negativa que ocorre na fonte normal de liberação para um dado hormônio. Por outro lado, os tumores ectópicos secretam grandes quantidades de um hormônio que, habitualmente, não seria secretado pelo tecido portador desse hormônio, e essa secreção também não está sujeita aos mecanismos normais de controle. Por exemplo, alguns tumores pulmonares comumente secretam hormônios como a adrenocorticotrofina (ACTH) e o hormônio antidiurético (ADH). Apesar de sua origem incomum, esses hormônios são plenamente funcionais e causam os mesmos sintomas que seriam observados caso fossem hipersecretados a partir de suas fontes normais (hipófise anterior e posterior, respectivamente).

Outra causa de hipersecreção, que está sendo diagnosticada com frequência cada vez maior, é a imunológica. Por exemplo, no tipo mais comum de hipertiroidismo (doença de Graves) é causado por estimulação excessiva da secreção tireoidiana, não por seu hormônio trófico normal, porém por uma imunoglobulina que pode simular a ação do hormônio trófico.

Ocasionalmente, os hormônios são secretados em quantidades aumentadas devido a anormalidades genéticas que causam regulação anormal da síntese ou liberação hormonal. Por exemplo, no hiperaldosteronismo parcialmente controlado por glicocorticoide, um evento de transposição no cromossomo coloca o gene que codifica a enzima aldosterona-sintase sob o controle do ACTH. A formação desse novo gene é devida à recombinação aberrante entre os genes da 11-γ-hidroxilase e da aldosterona-sintase, formando uma quimera composta pela porção regulatória proveniente do gene da 11-γ-hidroxilase e a porção codificadora do gene aldosterona-sintase.

A via de transdução de sinal pode conter uma proteína anormal que sinaliza continuamente a ocupância do receptor pelo hormônio. Nos últimos anos, anormalidades da transdução do sinal celular envolvendo mutações ativadoras no gene *GNAS1*, que codifica a proteína G$s\gamma$, têm sido descritas em várias condições patológicas, como tumores endócrinos isolados.

Finalmente, excesso de hormônio pode ser ingerido de forma acidental, deliberada ou terapeuticamente. Certos hormônios anabólicos (androgênios e hormônio do crescimento) são amplamente utilizados de forma abusiva por atletas. Evidentemente, esses casos não envolvem hipersecreção de um órgão endócrino, porém o resultado é o mesmo, já que os receptores não diferenciam entre fontes endógenas e exógenas dos hormônios.

Em condições de excesso de produção hormonal podem ocorrer síndromes de especificidade *Spillover*: Um hormônio pode ter uma forte afinidade por seu receptor e alguma afinidade pelo receptor de outro hormônio, isto é, conhecido por especificidade *spillover*. Tal especificidade *spillover* ou reação cruzada geralmente ocorre entre hormônios com estruturas similares. Em níveis hormonais fisiológicos, a especificidade *spillover* não causa consequências. Mas se um hormônio é produzido em excesso, contudo, o hormônio não apenas causa um efeito biológico excessivo pelo seu próprio receptor, mas também causa resposta fisiológica pela interação com o receptor de seu hormônio estruturalmente similar. Assim, altas concentrações de glicocorticoides, em adição aos efeitos do excesso de glicocorticoide, podem produzir efeitos de excesso de mineralocorticoides.

Um número significativo de pacientes apresenta excesso de prolactina evidenciado por galactorreia, amenorreia (ausência ou suspensão de menstruação) e infertilidade, possivelmente devido à ligação do GH em receptores para prolactina. De modo semelhante, pode ocorrer hipotireoidismo associado a tumores trofoblásticos (um câncer raro que se desenvolve de ovos anormais fertilizados), que produzem grandes quantidades de hCG, que pode se ligar com alta afinidade ao receptor de TSH.

Outras desordens que parecem dever-se à especificidade *spillover* é o hiperandrogenismo com formas associadas à severa resistência à insulina (reatividade cruzada da insulina com outros receptores ovarianos para IGF-I) e possível macrossomia em crianças de mães diabéticas (reatividade cruzada da insulina com receptores para IGF-1 em tecidos somáticos).

Resposta alterada dos tecidos

Estados de deficiência hormonal podem ser reproduzidos por condições patológicas nos quais os hormônios são sintetizados e liberados em concentrações adequadas, mas os tecidos-alvos tornam-se resistentes à ação hormonal. Desordens de resistência das células-alvo podem ser devidas à síntese insuficiente de receptor, interferência da ligação ao receptor (presença de um anticorpo antirreceptor), uma anormalidade estrutural do receptor, ou defeitos nos eventos moleculares que ocorrem após ligação do hormônio ao receptor. Essas síndromes, embora relativamente raras, usualmente resultam em consequências severas. Alteração da função do receptor ou transdução alterada pode causar uma variedade de doenças endócrinas congênitas ou adquiridas.

- **Anormalidades na ação hormonal:** Essas síndromes são geralmente causadas por mutações/deleções/ablações nos receptores de um dado hormônio, que então se torna incapaz de se ligar a ele e mediar seu efeito no tecido ou célula-alvo, apesar do hormônio estar presente em quantidades normais ou mesmo elevada. Na síndrome da insensibilidade a androgênio (SAI) ocorrem mutações no gene que codifica para o receptor de androgênio, podendo ser classificada como completa ou parcial, dependendo da quantidade da função resisual do receptor. Na SAI completa as concentrações circulantes de testosterona dos pacientes são maiores ou iguais às encontradas em mulheres saudáveis. As concentrações de LH estão aumentadas, presumivelmente devido à resistência do sistema hipotalâmico-pituitário a inibição androgênica. Também se tem observado resistência a hormônios previamente funcionais ao longo do tempo. Esse tipo de resistência é proveniente

de uma falha do acoplamento eficiente da sinalização do receptor com as vias efetoras intracelulares a jusante, que normalmente medeiam o efeito hormonal. O exemplo mais comum desse tipo de resistência é o diabetes tipo 2, em que os tecidos-alvos gradativamente vão se tornando mais e mais resistentes à ação da insulina, secundariamente à redução da ativação do fosfatidilinositol-3-quinase e outras vias de sinalização intracelular. Mutações com perda de função da cadeia β do receptor intracelular do hormônio tireoidiano leva a uma síndrome rara de resistência ao hormônio tireoidiano. Nesta condição, concentrações de T_4 e T_3 (total e livre) mais elevadas que a fisiológica são requeridas para manter o estado eutireoidiano. Assim, na ausência de hipertiroidismo clínico, se concentrações elevadas dos hormônios tireoidianos na forma total ou livre estiverem presentes com TSH no limite superior do intervalo de referência ou levemente elevado, resistência ao hormônio tireoidiano é provável. Por causa do estímulo tireoidiano pelo TSH, aumento da glândula pode estar presente por não haver resistência ao TSH. Alguns pacientes afetados podem apresentar achados clínicos de hipotireoidismo.

- **Anormalidades no metabolismo hormonal:** Essas síndromes também podem ser causadas pela deficiência de uma enzima que seja necessária para a ativação do hormônio. Paciente com deficiência da enzima 5α–-redutase, há concentrações adequadas de testosterona na circulação. Contudo, em muitos tecidos não há resposta a esse hormônio porque essa enzima é necessária para a conversão intracelular da testosterona ao metabólito ativo di-idrotestosterona. Altas razões da concentração circulante de testosterona para di-hidrotestosterona são indicativas da deficiência da enzima 5-alfarredutase. Uma forma de resistência ao hormônio tireoidiano resulta da deficiência na conversão de T_4 em T_3. Essa condição resulta da mutação no gene *SECISBP2*, que influencia a síntese celular de deiodinases, fazendo as concentrações plasmáticas de TSH se apresentarem levemente elevadas, T_4 livre elevado, T_3 diminuído, e T_3 reverso elevado.
- **Anormalidades no transporte hormonal:** MCT8 é um importante transportador dos hormônios tireoidianos (T_4 e T_3) nos neurônios e foi mostrado que mutações no gene que codifica para este transportador resultam em severo retardo psicomotor e alteração da função tireoidiana, com concentrações plasmáticas elevadas de T_3, normais a baixas de T_4 (total e livre), normais a elevadas de TSH e baixas de T_3 reverso.

Vários hormônios circulam como complexos com proteínas transportadoras. As proteínas carreadoras solubilizam compostos lipofílicos como hormônios esteroidais para facilitar seu transporte no ambiente circulatório primariamente aquoso e tamponam a concentração do hormônio livre, hormônio ativo no tecido. Com relação aos mecanismos de regulação, acredita-se que a taxa de secreção hormonal seja ajustada pelo nível de hormônio livre, o que faz com que a síntese de um determinado hormônio seja controlada de forma independente do tamanho do reservatório hormonal ligado às proteínas transportadoras. Como consequência, um aumento ou uma diminuição da concentração das proteínas transportadoras têm pequeno efeito no impacto tecidual dos hormônios transportados. A despeito da grande afinidade de algumas proteínas carreadoras para seus ligantes, uma proteína específica pode não ser essencial para a distribuição hormonal. Por exemplo, em humanos com deficiência congênita da Globulina ligadora de tiroxina (TBG), outras proteínas como a transtirretina (TTR) e albumina assumem sua função. O fato de a afinidade dessas proteínas transportadoras secundárias do hormônio tireoidiano ter menor magnitude que a TBG, é possível para o sistema de retroalimentação hipotálamo-hipófise manter as concentrações normais do hormônio tireoidiano livre e uma concentração mais baixa do hormônio total. O fato da concentração do hormônio tireoidiano livre se manter normal na deficiência de TBG indica que é essa fração livre que é mantida pelo eixo hipotálamo-hipófise, e que essa fração é o hormônio ativo. Em situações de excesso, o mesmo ocorre no excesso congênito de TBG e formas anormais de albumina e pré-albumina ligadora de tiroxina (TBPA), nas alterações e concentrações de T_4 total sem afetar T_4 livre, T_3 total e T_3 livre. Contudo, hipertri-iodotironinemia isolada eutiroidiana (com todos os outros parâmetros tireoidianos normais), causada por uma forma rara de disalbuminemia, foi reportada.

Anormalidades endócrinas múltiplas

Doenças endócrinas podem ocorrer associadas com outras doenças de origem autoimunes ou não autoimunes.

As neoplasias endócrinas múltiplas são doenças hereditárias raras, nas quais ocorre o desenvolvimento de tumores benignos ou malignos (cancerosos) em várias glândulas endócrinas. Os tumores das neoplasias endócrinas múltiplas podem aparecer precocemente na infância, ou tardiamente, em torno dos 70 anos de idade. As alterações causadas pelas neoplasias endócrinas múltiplas são decorrentes, sobretudo, do excesso de hormônios produzidos pelos tumores. As neoplasias endócrinas múltiplas ocorrem em três padrões, denominados tipos I (Tumores de paratireoides, de pâncreas, de hipófise ou de todas essas glândulas), IIA (podem consistir em um tipo raro de câncer de tireoide, em um feocromocitoma e na hiperatividade das paratireoides), e IIB (câncer medular da tireoide, em um feocromocitoma e em neuromas), embora, ocasionalmente, ocorra a sobreposição de tipos.

Síndromes poliglandular autoimune (SPA) formam um grupo diferente de desordem autoimune e são endocrinopatias raras caracterizadas pela existência de ao menos duas doenças glandulares autoimunes mediadas. Os dois subtipos principais de SPA, tipo I e tipo II, são distinguíveis de acordo com a idade de apresentação, padrões de combinações característicos de doença e modo de herança. A coexistência de insuficiência adrenal ou com doença tireoidiana autoimune e/ou diabetes tipo 1 é definida como síndrome de Carpenter.

A Tabela 10.1 traz as desordens endócrinas mais comuns, suas causas e características.

Tabela 10.1 Doenças endócrinas.

Doença endócrina	Causa	Característica
Síndrome de Cushing	Excesso de glicocorticoides (qualquer causa)	Obesidade central, hipertensão, intolerância à glicose, face em lua cheia, nódoas negras, osteoporose.
Bócio	Crescimento da glândula tireoide	A secreção dos HT pode estar alta, baixa ou normal.
Tireotoxicose	↑ de T_3 e T_4 por qualquer causa	Perda de peso, intolerância ao calor, aumento dos batimentos cardíacos, depressão.
Hipotireoidismo	↓ de T_3 e T_4 por qualquer causa	Ganho de peso, intolerância ao frio, fraqueza muscular, diminuição dos batimentos cardíacos, depressão.
Hipogonadismo	Qualquer causa Homem: ↓ testosterona Mulheres: ↓ estrogênio	Infertilidade, impotência, diminuição das características sexuais secundárias. Amenorreia, infertilidade, osteoporose.
Síndrome do ovário policístico	Aumento de androgênios em mulheres	Anormalidade dos períodos menstruais, diminuição da fertilidade, hirsutismo, obesidade, intolerância à glicose.
Menopausa	↓ estrogênio e fim da vida reprodutiva	Finalização dos períodos menstruais, infertilidade, ondas de calor, osteoporose.
Diabetes mellitus	Tipo 1: Falta de secreção de insulina Tipo 2: Falta de ação da insulina e diminuição da secreção de insulina	Perda de peso, polidipsia, poliúria, cetoacidose, complicações micro e macrovasculares. Obesidade, polidipsia, poliúria, complicações micro e macrovasculares.
Síndrome metabólica	Resistência à insulina	Combinação de obesidade, intolerância à glicose, hipertensão, ↑ do colesterol.
Secreção hormonal ectópica	Secreção hormonal por tumores celulares	Depende do hormônio secretado.
Diabetes *insipidus*	Central: falha na secreção de ADH Nefrogênica: várias causas	Falha da capacidade de concentrar a urina, desidratação, polidipsia, poliúria.
SIADH	↑ de AVP	Retenção inapropriada de água, baixo sódio plasmático.
Acromegalia	↑ de GH em adultos	Crescimento de tecidos moles e vísceras, intolerância a glicose
Hiperprolactinemia	↑ de prolactina	Mulheres: amenorreia, infertilidade, galactorreia. Homens: desenvolvimento das mamas, galactorreia.
Pan-hipopituitarismo	↓ dos hormônios da hipófise anterior	Características de ↓ dos hormônios: GH, LH, FSH, ACTH e TSH.
Fecromocitoma	↑ de adrenalina e noradrenalina	Elevação da pressão sanguínea, ↑ dos batimentos cardíacos, ansiedade.

(*Continua*)

Tabela 10.1 Doenças endócrinas. (*Continuação*)

Doença endócrina	Causa	Característica
Hiperplasia adrenal congênita	Secreção anormal de esteroides adrenais	Crianças: falha no desenvolvimento e virilização de meninas.
Doença de Addison	Insuficiência adrenal primária: ↓ cortisol e aldosterona	Fraqueza, hipotensão, desidratação, ↓ de sódio e ↑ de potássio.
Doença de Graves	↑ de T_3 e T_4 por causa autoimune	Como tireotoxicose com oftalmopatia e mixedema.
Tireoidite de Hashimoto	↓ de T_3 e T_4 por causa autoimune	Como hipotireoidismo.
Síndrome de Klinefelter	Anormalidade cromossomal XXY	Hipogonadismo masculino.
Síndrome de Turner	Anormalidade cromossomal X0	Ausência de puberdade feminina, os períodos menstruais não iniciam, infertilidade, anormalidades cardiovasculares.
Insuficiência ovariana prematura	↓ estrogênio, menopausa antes dos 40 anos	Como menopausa.
Hiperparatireoidismo	Primário: ↑ de PTH Ectópico: ↑ de PTHrp	Hipercalcemia (cálculos), desidratação.
Osteomalacia	Deficiência de vitamina D em adultos	↓ da densidade óssea, fraturas patológicas.
Gigantismo	↑ de GH em crianças	Crescimento aumentado, especialmente na altura, na infância.
Síndrome de laron	Anormalidade do receptor do GH	Diminuição do crescimento em crianças.
Síndrome de Sheehan	Interrupção do fluxo sanguíneo para pituitária	Como pan-hipopituitarismo.
Doença de Cushing	↑ de ACTH pituitário	Como síndrome de Cushing.
Síndrome de Conn	Excesso de aldosterona	Hipertensão, baixas concentrações plasmáticas de potássio.
Cretinismo	↓ de T_3 e T_4 no útero ou hipotireoidismo congênito	Retardo mental severo.
Síndrome de Kallmann	Causa hipogonadismo terciário em homens	Como hipogonadismo com anosmia (↓ total do olfato).
Abuso de esteroide androgênico anabólico	↓ de testosterona	Infertilidade, atrofia testicular masculina, virilização nas mulheres.
Raquitismo	Deficiência de vitamina D em crianças	↓ da mineralização óssea, deformidades ósseas.
Hipoparatireoidismo	↓ de PTH	Hipocalcemia, comichões, tetania, convulsões.
Síndrome de Zollinger-Ellison	↑ da gastrina	Severa ulceração péptica.
Neoplasia endócrina múltipla	Vários	Tumores de diferentes glândulas endócrinas.

Abreviações: IOG: intolerância oral à glicose; HT: hormônios tireoidianos; T_3: tri-iodotironina; T_4: tiroxina; ADH: hormônio antidiurético; SIADH: síndrome do inapropriado hormônio antidiurético; AVP: vasopressina; GH: hormônio do crescimento; LH: hormômio luteinizante; FSH: folículo estimulante; ACTH: adrenocorticotrópico; TSH: tireotropina, PTH: hormônio da paratireoide; PTHrp: peptídeo relacionado ao hormônio da paratireoide.
Símbolos: ↓: diminuição; ↑: aumento.
Fonte: Tradução de Hinson, Haven e Chew, 2010.

CLASSIFICAÇÃO DE DOENÇAS ENDÓCRINAS

Doenças primárias e secundárias

Tanto as desordens de hiposecreção como hipersecreção são classificadas em primárias e secundárias, dependendo se o distúrbio ocorre no interior do órgão produtor do hormônio (primária) ou se é devido à alteração de estimulação adequada por hormônios que controlam a produção hormonal de dado órgão (secundária). Isso ocorre porque existem várias etapas de controle que auxiliam a secreção final de um dado hormônio (Figura 10.1).

Desta forma, um órgão endócrino que esteja secretando pequenas ou grandes quantidades de seu hormônio pode fazê-lo devido a uma anormalidade do interior do mesmo; esse distúrbio é então considerado primário. Por outro lado, caso o órgão seja normal, mas esteja secretando o hormônio de forma anormal simplesmente porque está recebendo pouca (hipossecreção) ou muita (hipersecreção), hormônio trófico correspondente, nesse caso a anormalidade é denominada secundária. Essas condições estão ilustradas na Figura 10.3, para os órgãos-alvo (adrenais, tireoide e gônadas) que são regulados pelos hormônios tróficos da pituitária anterior.

Observar que nos casos de hipofunção, a secreção do hormônio pela glândula-alvo está, por definição, abaixo do normal, enquanto a secreção do hormônio trófico pode estar anormalmente elevada (hipofunção primária) ou reduzida (hipofunção secundária). Caso exista hiposecreção secundária, por definição, a secreção do hormônio trófico está reduzida, como o hormônio da glândula-alvo, uma vez que falta estímulo para a produção deste último. Caso haja um distúr-

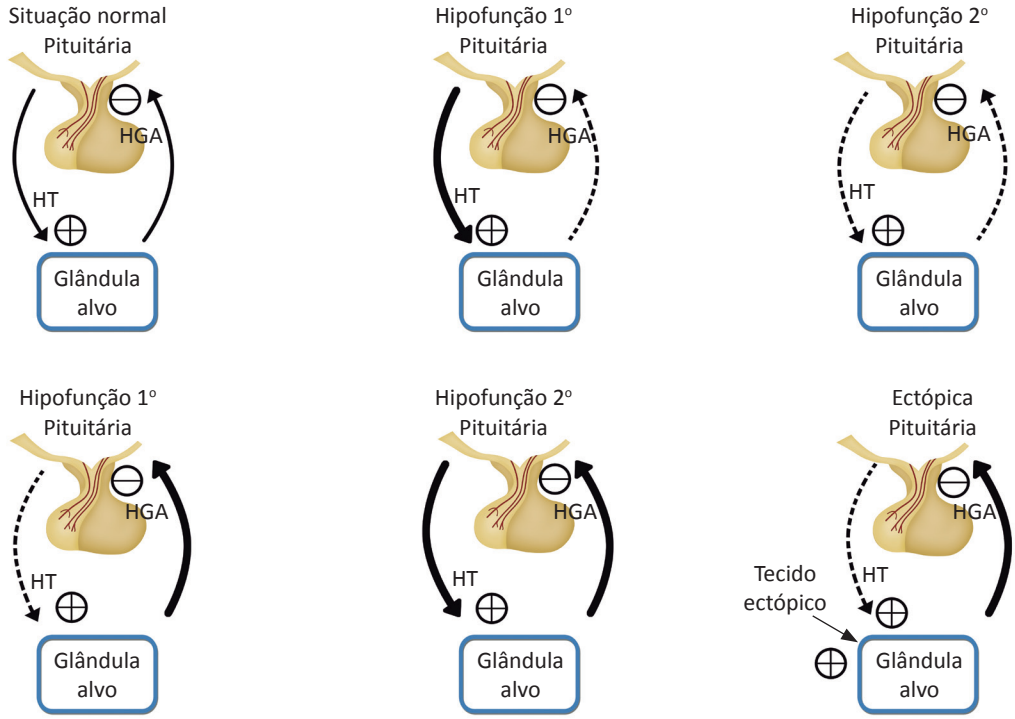


Figura 10.3 Classificação das doenças endócrinas em hipo e hipersecreções primárias, hipo e hipersecreções secundárias ou hipersecreção ectópica. Na figura estão representadas seis situações de secreção de um dado hormônio por uma glândula-alvo (HGA: hormônio da glândula alvo) sob controle do hormônio trófico (HT) específico liberado pela pituitária anterior. **Situação normal:** O HT estimula a produção do HGA pela glândula-alvo, o qual por retroalimentação negativa controla sua produção normal, mantendo em concentrações adequadas. **Hipofunção 1:** A glândula-alvo devido a alguma anormalidade não responde ao HT sintetizando o HGA, resultando na elevação da concentração do HT por não haver regulação por retroalimentação negativa. **Hipofunção 2:** Por haver alguma anormalidade na pituitária, o HT não é produzido, não havendo estímulo da glândula-alvo para a produção do HGA, havendo concentrações diminuídas de ambos os hormônios. **Hiperfunção 1:** Devido a alguma anormalidade, a glândula-alvo está produzindo HGA em altas concentrações, que pelo mecanismo retroalimentação negativa suprime a produção de HT, diminuindo suas concentrações. **Hiperfunção 2:** Por haver alguma anormalidade na pituitária, o HT não é produzido em altas concentrações, ocasionando grande estímulo da glândula-alvo para a produção do HGA, havendo concentrações elevadas de ambos os hormônios. **Ectópico:** Algum tumor ectópico está produzindo grandes quantidades de HT, estimulando a glândula-alvo a produzir grandes quantidades de HGA, o qual pelo mecanismo retroalimentação negativa suprime a produção de HT, mas apenas pela pituitária, não pelo tumor ectópico, fazendo com que as concentrações tanto de HT como de HGA se encontrem elevadas. Estimulação e inibição são representadas por (⊕) e (⊖), respectivamente. As setas azuis finas representam síntese de HT e HGA em concentrações adequadas, as setas azuis grossas altas concentrações e as setas azuis pontilhadas baixas concentrações.

Fonte: Adaptada de Hedge, Colby e Goodman, 1987.

bio primário, o hormônio trófico está aumentado devido à redução das concentrações do hormônio da glândula-alvo, que produzem menor inibição por retroalimentação negativa sobre a secreção do hormônio trófico, fazendo com que este último tenha suas concentrações elevadas.

Nos casos de hiperfunção, a secreção do hormônio pela glândula-alvo está, por definição, acima do normal, enquanto a secreção do hormônio trófico pode estar reduzida (hiperfunção primária) ou anormalmente elevada (hiperfunção secundária). Caso haja um distúrbio primário, o hormônio trófico está diminuído devido à inibição de sua síntese por retroalimentação negativa exercida pelas altas concentrações do hormônio da glândula-alvo. Caso exista hipersecreção secundária, por definição, a secreção do hormônio trófico está aumentada, como o hormônio da glândula-alvo, uma vez que há excesso de estímulo para a produção deste último.

Tumores ectópicos

Não são apenas tecidos endócrinos bem-definidos que são capazes de secretar hormônios. Todas as células retêm a capacidade para secreção hormonal e é bem reconhecido que células malignas podem expressar genes codificantes de peptídios hormonalmente ativos. O mecanismo usual para o processamento hormonal não está presente nessas malignidades, o peptídio secretado pode ser um fragmento ou um precursor de um hormônio maduro normal. A secreção inapropriada desses hormônios por tecidos que usualmente produzem determinado hormônio são denominados secreção hormonal ectópica. Frequentemente, secreção hormonal ectópica é observada como característica de tumores endócrinos, por exemplo, carcinoma de células de ilhotas pancreáticas podem ocasionalmente secretar hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), usualmente secretado pela glândula pituitária. Tecidos não endócrinos também podem secretar hormônios, por exemplo, a secreção inapropriada de ACTH é uma característica reconhecida de algumas pequenas células de carcinomas de pulmão. O exemplo mais comum de secreção ectópica hormonal é um hormônio peptídico denominado peptídeo relacionado ao hormônio da paratireoide (PTHrp), o qual é secretado aproximadamente por 10% dos tumores malignos e causa a hipercalcemia, denominada hipercalcemia maligna.

A Figura 10.3 traz a representação da hipersecreção ectópica de um hormônio originalmente produzido pela pituitária. Esse hormônio ectópico estimulará a glândula-alvo a produzir altas concentrações de hormônio, que por retroalimentação negativa inibirá a pituitária a produzir o hormônio trófico, mas não inibirá o tumor ectópico. Nesta situação, tanto o hormônio trófico produzido pelo tumor ectópico como o hormônio da glândula-alvo encontram-se em concentrações elevadas.

O diagnóstico da secreção ectópica é realizado por uma abordagem de imagem, combinada à dosagem da concentração hormonal na irrigação arterial ou venosa de um tecido, e, assim, estabelecendo a fonte hormonal.

Doenças terciárias

Em algumas situações de hipofunção, porém mais raras, a alteração da produção anormal do hormônio pela glândula-alvo seja devida ao estímulo inadequado, mas não pelo hormônio trófico, e, sim, pelos fatores de liberação hipotalâmicos, constituindo uma desordem terciária. Os hormônios do hipotálamo não são normalmente secretados em abundância. Mesmo sendo possível sua dosagem, na insuficiência adrenal, por exemplo, a dosagem do CRH basal não tem utilidade devido a discrepâncias obtidas nos resultados. Desta forma, são solicitados diferentes testes de estímulo, para verificar a capacidade de adaptação de seu eixo hipotálamo-pituitária, os quais serão discutidos mais adiante. Exemplificando, em uma situação de esterilidade em que as concentrações plasmáticas de LH e FSH encontram-se diminuídas, será feito teste de estímulo com GnRH. Isto pode ser feito pela administração intravenosa de GnRH sintético, que por esta via chegará às células gonadotrópicas da pituitária anterior e desencadear a secreção de LH e FSH. Uma progressão da resposta pode ser medida e estará dentro dos valores normais (terciário) ou estará claramente diminuída (secundário). Se a resposta for deficiente, as células da pituitária anterior não estão funcionando adequadamente e são a causa da síndrome (secundário). Por outro lado, resposta normal da pituitária ao GnRH indicaria que o hipotálamo não está funcional (terciário). Tal descoberta sugeriria exame do hipotálamo quanto às condições que levam à disponibilidade/produção insuficiente de hormônios liberadores.

INVESTIGAÇÃO ENDÓCRINA

A investigação de uma desordem endócrina é usualmente indicada com a dosagem plasmática das concentrações hormonais. Em alguns casos, essa dosagem pode ser suficiente para determinar a existência de uma desordem, mas quando o hormônio sobre investigação é secretado de forma episódica (tais como GH e cortisol), dosagem em um único momento (teste basal) frequentemente apresenta um valor muito limitado. No diagnóstico de alterações parciais dos mecanismos de controle endócrinos podemos utilizar três tipos de testes funcionais: dosagens hormonais seriadas, dosagens de pares hormonais, e testes dinâmicos (testes de reserva endócrina e retrocontrole endócrino). Todos os três são de máxima importância no diagnóstico, mas podem sofrer a influência de inúmeros fatores que tornariam sua interpretação bastante complexa.

Existem duas situações gerais para a realização da investigação endócrina. A primeira é para confirmar um diagnóstico, e a segunda para monitorar a progressão de uma doença. Existem várias possibilidades de testes que têm por objetivo a confirmação diagnóstica e, portanto, um grau de seleção e julgamento tem de ser introduzido. A seleção dos testes precisa ser guiada pela condição clínica. Uma abordagem é a de fazer um diagnóstico clínico baseado no reconhecimento de padrões. Por exemplo, uma combinação clássica dos sintomas

da doença endócrina é a perda de peso, apesar de um bom apetite (visto em tireotoxicose), o que poderia levar à avaliação da glândula tireoide. A segunda abordagem é a utilização dos princípios básicos de fisiologia e anatomia para orientar os testes de diagnóstico. Isso é necessário se o padrão clínico não estiver claro, ou um resultado surpreendente for encontrado. Por exemplo, pode ter sido encontrada fibrilação atrial (um ritmo cardíaco irregular) em um paciente submetido a um exame de rotina antes de uma cirurgia. Uma vez que as concentrações elevadas de hormônios tireoidianos estimulam o coração, e em particular as câmaras atriais, isto deveria levar a teste de função da tireoide, mesmo na ausência de outros sintomas clássicos.

Dosagem basal

Os testes mais utilizados em endocrinologia quantificam hormônios e eletrólitos em amostras de sangue. As concentrações hormonais variam durante o dia, e os intervalos de referência são dependentes da hora em que a amostra foi obtida. Desta forma, os valores de intervalos de referência são usualmente baseados em amostras em jejum obtidas às 9 horas. É vital para a correta interpretação de um resultado de exame de sangue que a hora em que a amostra foi obtida seja registada. Essas amostras são também conhecidas como amostras basais, uma vez que representam o estado basal ou não estimulado.

A dosagem isolada dos hormônios nem sempre permite a distinção entre o normal e o patológico. As largas faixas de normalidade para concentrações séricas de alguns hormônios tornam imprecisa a interpretação de valores individuais se o valor normal prévio para determinado paciente for desconhecido. Por exemplo, uma concentração sérica de tiroxina (T_4) no limite máximo para a população em geral pode estar associada a hipertireoidismo em um paciente cuja concentração, usualmente, estaria no limite mínimo da faixa de normalidade. Além disso, há pequenos níveis de disfunção endócrina que podem estar compensados em condições basais. Portanto, as concentrações séricas de cortisol podem estar normais em pacientes com insuficiência adrenocortical parcial devido ao aumento de secreção de corticotrofina (ACTH).

Dosagens hormonais seriadas

Em algumas circunstâncias, a variação de secreção hormonal reflete processos pouco compreendidos de exacerbação ou de remissão de patologias. Dessa forma, dosagens seriadas das concentrações plasmáticas de cálcio e PTH (paratormônio) por períodos prolongados podem ser necessárias para diagnóstico de hiperparatireoidismo. Outras condições clínicas, como a síndrome de Cushing, podem apresentar o mesmo padrão de exacerbação/remissão. Em outras circunstâncias, a variação na secreção hormonal endócrina resulta de alterações rítmicas, como uma secreção pulsátil ou um ritmo circadiano básico. A perda do ritmo circadiano de secreção de cortisol pode ser um sinal precoce de síndrome de Cushing. O ritmo circadiano da secreção hormonal pode ser alterado por inúmeros fatores, como distúrbios do sono, drogas, doenças psiquiátricas e estresse. A demonstração de uma variação diurna normal pode ser uma boa evidência de normalidade em sua função. No entanto, sua ausência não indica necessariamente uma doença endócrina primária. Na verdade, alterações desse ritmo circadiano indicam a necessidade de testes diagnósticos adicionais.

Dosagem de pares hormonais

Como o sistema endócrino funciona basicamente sob retrorregulação, a dosagem de pares hormonais (T_4 e TSH, cálcio e PTH, testosterona e LH) permite uma avaliação das concentrações individuais. Por exemplo, uma vez que a faixa de normalidade do T_4 é ampla, as concentrações de determinado paciente poderiam cair para a metade e ainda permanecer na faixa normal. Nesse caso, contudo, uma concentração de T_4 próxima aos limites mínimos normais, associada a elevadas concentrações de TSH, indicam o estágio inicial de uma doença tireoidiana compensada. Baixas concentrações de ambos os pares hormonais apontam deficiência do hormônio trófico (desordem secundária ou terciária). Altas concentrações do hormônio-alvo com baixas concentrações do hormônio trófico sugerem secreção autônoma do órgão-alvo (desordem primária). Elevadas concentrações de ambos os pares hormonais são compatíveis com os mecanismos de várias doenças. A secreção autônoma de um hormônio trófico pode ser tópica (secundária) ou ectópica. Por exemplo, a síndrome de Cushing pode resultar da secreção pituitária de ACTH ou da secreção de ACTH por tumores pulmonares. Outra possibilidade é a secreção de fatores liberados a partir de tumores em órgãos periféricos, causando hipersecreção de hormônios pituitários, por exemplo, a acromegalia resultante da secreção ectópica de fatores liberadores do hormônio de crescimento. Por outro lado, a elevação combinada do hormônio trófico e do hormônio da glândula-alvo pode se dever à resistência à ação do hormônio da glândula-alvo. Essa resistência pode ser herdada (como nos casos de defeito de receptor de andrógenos que causam resistência à ação do hormônio e resultam em níveis elevados de LH e de testosterona), ou adquirida (como no caso de resistência insulínica da obesidade, que pode levar a hiperinsulinismo e hiperglicemia). Assim, a elevação de TSH e T_4 pode indicar tanto secreção autônoma de TSH quanto resistência à ação do T_4.

Testes dinâmicos

Os testes dinâmicos são utilizados para diferenciar as causas das doenças endócrinas (primárias, secundárias e terciárias) ou para detectar anormalidades que podem não ser obtidas pelos resultados basais. O principio do teste dinâmico é simples. Quando um excesso hormonal é suspeitado, o objetivo do teste dinâmico é suprimir a concentração hormonal. Se, por outro lado, suspeita-se de insuficiência de secreção hormonal, o objetivo do teste é estimular a secreção. As amostras são coletadas em tempos específicos, após estimulação ou supressão. Esses testes visam verificar todo o sistema tanto quanto possível.

- **Testes de estímulo:** São utilizados na suspeita de hipofunção endócrina para avaliar a capacidade de reserva de síntese e secreção hormonal. Esses testes são realizados de duas maneiras: 1) Administração de um hormônio trófico para testar a capacidade do órgão-alvo de aumentar a produção hormonal. Esse hormônio pode ser um fator liberador hipotalâmico, como o TRH, ou um hormônio pituitário, como o ACTH. Nesses casos, a capacidade do órgão-alvo é avaliada pela mensuração dos níveis hormonais séricos – nos exemplos citados, o TSH e o cortisol; 2) Estimulação da secreção de um hormônio trófico endógeno ou fator estimulador e medição do efeito desses estímulos antiestrogênicos em nível hipotalâmico, diminuindo o retrocontrole negativo e causando um aumento na secreção de gonadotrofinas, que pode ser seguido por ovulação e/ou aumento na formação de esteroides gonadais. A Tabela 10.2 resume os testes de estímulo mais comuns.
- **Testes de supressão:** São utilizados casos de suspeita de hiperfunção endócrina. Como nos testes de estímulo são utilizados hormônios exógenos ou fatores reguladores conhecidos para avaliar a inibição da produção hormonal endógena, por exemplo, a administração de glicocorticoide (dexametasona) a pacientes com suspeita de síndrome de Cushing para avaliar a capacidade de inibição da secreção do ACTH e, portanto, da síntese adrenal de cortisol. A falência da supressão nesses testes indica a presença de secreção autônoma do hormônio da glândula-alvo ou de hormônios tróficos (pituitários ou de sítios ectópicos), que não estão sob retrorregulação normal (Tabela 10.3).

Os testes dinâmicos fornecem a melhor avaliação dos distúrbios endócrinos leves, por exemplo, o teste de estímulo com cortrosina (ACTH sintético) para diagnosticar insuficiência adrenocortical parcial com secreção de cortisol basal normal. Os testes dinâmicos também são úteis na determinação do local do defeito endócrino, tal como o estímulo com GnRH para diagnosticar se o hipogonadismo hipogonadotrófico ocorre em consequência de insuficiência pituitária ou hipotalâmica. Em pacientes com síndrome de Cushing, a supressão da produção de cortisol em resposta a altas doses de dexametasona sugere hipersecreção pituitária de ACTH, uma vez que tumores adrenais ou secreção ectópica de ACTH não respondem ao teste de supressão.

Tabela 10.2 Testes de estímulo frequentes.

Órgão/Sistema	Estímulo	Resposta
Hipotálamo	Hipoglicemia	GH e ACTH (cortisol)
Pituitária	Metirapona	ACTH (cortisol e 11-desoxicortisol)
	Levodopa	GH
	Arginina	GH
	Citrato de clomifeno	Gonodotrofinas
	Exercício	GH
	Restrição hídrica	Vasopressina
Pituitária	TRH	TSH e prolactina
	GnRH	Gonodotrofinas
	CRH	ACTH (cortisol)
	GHRH	GH
Tireoide	TSH	Captação de iodo radioativo
Adrenal	Cortrosina	Cortisol
	Metirapona	Cortisol e 11-desoxicortisol
	Mudança de postura	Renina e aldosterona
Gônadas	HCG	Testosterona
Pâncreas	Glicose	Insulina
Balanço hídrico	Vasopressina	Concentração urinária

HCG: Gonadotrofina Coriônica.

Fonte: Modificada de Silveiro S. P.; *et al*., 2015.

Tabela 10.3 Testes de supressão frequentes.

Órgão/sistema	Agente supressor	Resposta
Hipotálamo-hipófise	Glicose Dexametasona	GH ACTH (cortisol)
Tireoide	T4	Captação de iodo radioativo
Adrenal	Dexametasona salina Clonidina	Cortisol Renina e aldosterona Noradrenalina plasmática

Fonte: Modificada de Silveiro S. P.; *et al*., 2015.

A principal dificuldade na interpretação dos testes é a definição adequada do que seja resposta normal em indivíduos normais que apresentam outras patologias. Por exemplo, os atletas têm uma resposta aumentada do ACTH e do cortisol ao estímulo com cortrosina. Além disso, inúmeros fatores influenciam na resposta de um teste funcional, tais como: idade, sexo, tabagismo, uso de determinadas drogas, obesidade, desnutrição, insuficiência renal crônica, cirrose hepática e outras patologias associadas. Por exemplo, a resposta do TSH ao estímulo com TRH diminui em homens com mais de 60 anos de idade. Citamos, ainda, a resposta subnormal do GH ao estímulo de hipoglicemia induzida por insulina e a administração de arginina e de levodopa em pacientes obesos, que normalizam após o retorno ao peso ideal. Por outro lado, pacientes com desnutrição grave, insuficiência renal crônica ou cirrose hepática costumam ter níveis de GH basal elevados, que não respondem à supressão ou respondem com um aumento paradoxal após sobrecarga de glicose. Na avaliação da baixa estatura, a realização de dois testes aumenta a sensibilidade de 80% para mais de 90%.

Várias doenças psiquiátricas estão associadas a testes dinâmicos da função endócrina, alterados na ausência de patologia endócrina específica. A mais frequente é a depressão. Pacientes com depressão primária grave não apresentam supressão adequada do cortisol, após administração de dexametasona, normalizando essa resposta após o tratamento da depressão. Em 20% dos pacientes com doença psiquiátrica aguda são encontradas concentrações elevadas de T4 e T4 livre sem evidência clínica de tireotoxicose. A resposta do TSH ao TRH apresenta-se subnormal ou ausente em aproximadamente 25% dos pacientes psiquiátricos sem doença tireoidiana, principalmente em casos de depressão unipolar ou bipolar.

O uso de drogas também interfere nos testes dinâmicos. Glicocorticoides em doses farmacológicas, progestágenos, teofilina e clorpromazina bloqueiam a resposta do GH aos estímulos usuais. A ingestão crônica e excessiva de álcool diminui a resposta da prova de supressão do cortisol à dexametasona. O uso de levodopa, de dopamina e de aspirina em altas doses bloqueia a resposta do TSH ao TRH. A fenitoína aumenta a captação celular e o metabolismo do T4, levando a baixos níveis de T4 livre, além de diminuir em 50% a resposta do TSH ao TRH. Portanto, a avaliação da função tireoidiana é prejudicada, principalmente quando nos encontramos frente a um paciente em uso dessa droga com níveis baixos de T4 e TSH normal.

Deve ser considerada, ainda, a possível necessidade de estímulos repetidos para a obtenção de uma resposta normal. Por exemplo, pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico por doença hipotalâmica com resposta subnormal do LH ao estímulo com GnRH podem normalizar a resposta ao teste após uma semana de administração diária de GnRH. Esse protocolo permite a distinção entre hipogonadismo hipotalâmico e pituitário.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Agrawal NK, Goyal R, Rastogi A, et al. Thyroid hormone resistance. Postgrad Med J. 2008;84(995):473-7.
2. Cheon CK. Practical approach to steroid 5alpha-reductase type 2 deficiency. Eur J Pediatr. 2011;170(1):1-8.
3. Choi K, Kim YB. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. Korean J Intern Med. 2010;25(2):119-29.
4. Clapham DE. Mutations in G protein-linked receptors: novel insights on disease. Cell. 1993;75(7):1237-9.
5. Drager LF, Krieger JE. A genetica das sindromes hipertensivas endocrinas. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2004;48(5):659-65.
6. Dumitrescu AM, Refetoff S. The syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone. Biochim Biophys Acta. 201;1830(7):3987-4003.
7. Fassbender WJ, Krohn-Grimberghe B, Gortz B, et al. Multiple endocrine neoplasia (MEN)--an overview and case report--patient with sporadic bilateral pheochromocytoma, hyperparathyroidism and marfanoid habitus. Anticancer Res. 2000;20(6C):4877-87.
8. Galani A, Kitsiou-Tzeli S, Sofokleous C, et al. Androgen insensitivity syndrome: clinical features and molecular defects. Hormones (Athens). 2008;7(3):217-29.
9. Grinspoon SK, Biller BM. Clinical review 62: Laboratory assessment of adrenal insufficiency. J Clin Endocrinol Metab. 1994;79(4):923-31.
10. Guillemin R. Hypothalamic hormones a.k.a. hypothalamic releasing factors. J Endocrinol. 2005;184(1):11-28.

11. Heuer H, Visser TJ. Minireview: Pathophysiological importance of thyroid hormone transporters. Endocrinology. 2009;150(3):1078-83.
12. Hoffman JR, Kraemer WJ, Bhasin S, et al. Position stand on androgen and human growth hormone use. J Strength Cond Res. 2009;23(5 Suppl):S1-S59.
13. Kahaly GJ. Polyglandular autoimmune syndromes. Eur J Endocrinol. 2009;161(1):11-20.
14. Kleerekoper M. Hormones. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Missouri: Elsevier, 2012. p.837.
15. Lefkowitz RJ. G-protein-coupled receptors. Turned on to ill effect. Nature. 1993;365(6447):603-4.
16. Neves C, Alves M, Delgado JL, et al. Doença de Graves. Arq Med. 2008;22(4/5):137-46.
17. Silveiro, S. P. e Satler, F. Rotinas em Endocrinologia. Porto Alegre: Artmed, 2015.
18. Vantyghem MC, Dobbelaere D, Mention K, et al. Endocrine manifestations related to inherited metabolic diseases in adults. Orphanet J Rare Dis. 2012;7:11.

11

capítulo

William Peres ▪ Maitê Peres de Carvalho ▪ Thalita Martinelli ▪ Rafael Bueno Orcy

Envelhecimento

INTRODUÇÃO

A idade cronológica, aquela que consta em nossos documentos de identidade, muitas vezes, difere da idade biológica do nosso organismo. Para que possamos obter informações mais aprofundadas desse processo biológico, faz-se necessário conhecer e interpretar diversos exames laboratoriais, sendo que muitos deles fazem parte da rotina das análises clínicas e outros ainda são apenas empregados em pesquisa, no entanto, provavelmente, em um futuro próximo serão parte integrante da rotina dos laboratórios clínicos.

No princípio do século passado, mais precisamente no ano de 1903, o cientista russo Élie Metchnikoff deu início à propagação do termo gerontologia, o qual refere-se ao estudo do envelhecimento de forma ampla, incluindo aspectos sociológicos, psicológicos, fisiológicos e bioquímicos. Como é possível perceber, o estudo do processo de envelhecimento possui mais de cem anos e envolve tanto o conhecimento quanto a inter-relação de diversas áreas da ciência.

O crescente aumento da população idosa em todo o mundo vem sofrendo, nas últimas décadas, transições importantes. Decorrentes de uma brusca queda nos níveis de mortalidade e fecundidade, essas mudanças evidenciam grandes desafios para a sociedade e os órgãos governamentais no que se refere à estrutura na área da saúde e aos aspectos socioeconômicos característicos do processo de envelhecimento.

Mundialmente, hoje, existem cerca de 600 milhões de pessoas com idade igual ou superior a 60 anos, e a estimativa é de que, em 2025, esse número duplique e, no ano de 2050, essa população alcance praticamente 2 bilhões (Figura 11.1). Particularmente nos países em desenvolvimento tal fenômeno tem sido percebido, e, no Brasil, revela-se um crescimento cuja projeção mostra-nos que, em 2025, o número de indivíduos com 60 anos ou mais será de, aproximadamente, 32 milhões. Porém, é importante ressaltar que muitas expectativas ao longo dos anos não chegaram a se confirmar efetivamente.

A feminização da velhice é um fenômeno que acompanha o envelhecimento da população, podendo atribuir-se tal acontecimento a questões como diferenças biológicas (fator de proteção conferido aos hormônios), atitude perante a doença e incapacidade (mulheres são mais cuidadosas com a saúde, percebendo mínimos sinais e sintomas), e diferenças quanto ao consumo do álcool e do tabaco, por exemplo, são alguns dos principais fatores que permitem às mulheres maior expectativa de vida. Entretanto, as idosas estão mais expostas que os homens à violência doméstica e à discriminação em diversos aspectos, significando maior possibilidade de apresentar múltiplos problemas de saúde e pertencer a classes sociais menos favorecidas nas idades mais longevas.

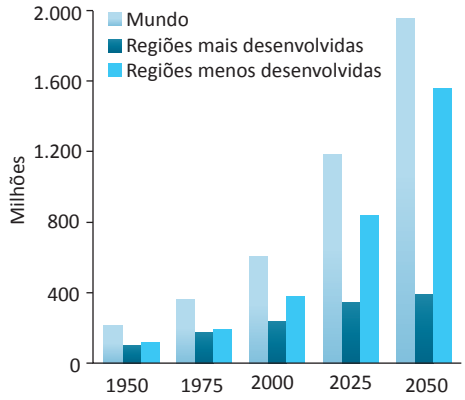


Figura 11.1 População com 60 anos ou mais de idade: mundo e regiões em desenvolvimento, 1950-2050.
Fonte: United Nations, New York (2009).

Em vista disso, as tendências das condições de saúde da população idosa vêm recebendo atenção de forma crescente e, portanto, torna-se imprescindível discernir os conceitos de senescência e senilidade para que o idoso não possua mais o estereótipo de doente. Enquanto a senescência é caracterizada pelas alterações típicas do processo gradual do envelhecimento, a senilidade trata das alterações ocasionadas em vista das distintas afecções que podem vir a acometer os idosos.

Diante dessa realidade demográfica e epidemiológica, os tradicionais indicadores de saúde tornam-se insuficientes para avaliar o bem-estar da população e, sob essa perspectiva, a qualidade de vida plena parece traduzir-se em um con-

ceito inatingível. A literatura demonstra que o aumento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) está diretamente relacionado à crescente demanda de idosos, indicando tratamento a longo prazo e uma recuperação tardia, e exigindo diversas vezes intervenções com risco elevado. Dessa forma, percebe-se a relevância da prevenção de sequelas limitantes da capacidade funcional a fim de proporcionar melhor qualidade à senescência.

O envelhecimento envolve distintos fatores endógenos e exógenos, os quais devem ser considerados de forma integrada e, devido a essa multifatorialidade, torna-se complexo estudar tal fenômeno de forma abrangente. A seguir, abordaremos alguns tópicos que merecem especial destaque quando nos referimos a essa temática.

TEORIAS ESTOCÁSTICAS

As Teorias Estocásticas consistem em alterações moleculares que ocorrem de forma acidental e aleatória, provocando, como consequência, alterações celulares que influenciam diretamente no processo de envelhecimento. Dentre esse grupo de teorias podemos destacar a "Teoria das Proteínas Alteradas", a qual se fundamenta nas modificações das moléculas de proteínas após a sua tradução. À medida que envelhecemos há um aumento dessas proteínas alteradas e, portanto, cabe ressaltar que uma das proteínas mais sensíveis a esses processos é o colágeno, localizado nos diversos tecidos, determinando diretamente o envelhecimento da pele, por exemplo, uma vez que torna as fibras colágenas mais rígidas e quebradiças.

Nas alterações em macromoléculas devemos chamar atenção ainda para o processo de glicação de proteínas, o qual parece ser um dos principais mecanismos responsáveis pelo fenômeno de envelhecimento celular. Nessa "Teoria de glicação" as reações não enzimáticas, do grupamento aldeído da glicose, com o grupo amino – presente nas proteínas – podem originar produtos finais de glicação avançada *(advanced glycosylation end products – AGEs)*. Um dos exemplos mais característicos desse processo é a formação de hemoglobina glicada. Essa hemoglobina recebe a denominação de *HbA1C* e encontra-se aumentada em pacientes diabéticos, tendo relação direta com o risco relativo de complicações microvasculares tais como: retinopatia, nefropatia e neuropatias.

Outra teoria estocástica é a "Teoria das Alterações Somáticas", a qual se baseia na fragilidade dos cromossomos humanos idosos quando comparados aos dos jovens; além disso, os danos aleatórios – decorrentes do passar dos anos nas sucessivas mitoses – provocariam alterações nesses cromossomos. As radiações ionizantes contribuiriam também para o aumento dos processos oxidativos em nível do DNA (ácido desoxirribonucleico), levando à ruptura de ligações ou à dimerização de bases nitrogenadas constituintes dos ácidos nucleicos.

Considera-se como uma das principais teorias desse grupo a "Teoria do Estresse Oxidativo", a qual pela formação excessiva de radicais livres e/ou da menor capacidade antioxidante do organismo levaria ao envelhecimento acelerado.

Os radicais livres são estruturas muito instáveis e reativas por apresentarem elétrons desemparelhados. O gás oxigênio (O_2), fundamental para a respiração (aproximadamente 20% do ar atmosférico) é uma estrutura paramagnética que apresenta dois elétrons desemparelhados (bi-radical livre). Essa molécula facilmente reage com íons de metais de transição (Fe^{2+}/Cu^{1+}) formando o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Esse ânion forma-se em nível da cadeia respiratória e no processo de fagocitose pela da enzima NADPH-oxidase. Através de um processo de dismutação, o ânion superóxido é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 pode sofrer uma cisão pela adição de um elétron formando o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$); esse radical é o mais instável de todos os radicais livres e, por conseguinte, o mais reativo e nocivo. Além dessas estruturas oxigenadas (Espécies Reativas de Oxigênio – EROs) forma-se também, em nível intracelular, o oxigênio singlet ($^1O_2$), o qual é mais reativo que o oxigênio molecular.

No grupo dos radicais livres existem, ainda, as espécies reativas de nitrogênio e o gás óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) é o seu principal representante, formando-se em nível celular a partir do aminoácido L-arginina por ação da enzima óxido-nítrico-sintase (NOS). Na atualidade, conhecem-se três isoenzimas que promovem a formação desse radical que são a óxido-nítrico-sintase neuronal (n-NOS), a óxido-nítrico-sintase induzível (i-NOS) e a óxido-nítrico-sintase endotelial (e-NOS). Esse gás está diretamente relacionado ao relaxamento da musculatura lisa, à diminuição da agregação plaquetária, e participa como neuromodulador em nível de sinapses. O óxido nítrico, por ser um radical livre, reage facilmente com o ânion superóxido formando o radical peroxinitrito ($ONOO^-$); essa espécie reativa de nitrogênio tem efeitos fisiológicos totalmente contrários ao óxido nítrico. Existem fortes evidências científicas de que o radical peroxinitrito seria responsável pela diminuição da formação de prostaciclinas (PGI2), e isso estaria diretamente relacionado à diminuição da vasodilatação, sendo uma das causas de hipertensão arterial.

As EROs são constantemente formadas no organismo: em nível de cadeia respiratória, fagocitose, citocromo P450, enzima xantina-oxidase, metabolismo do ácido araquidônico, dentre outros processos. Cabe destacar que na cadeia respiratória há fuga de elétrons, principalmente em nível da Coenzima-Q, levando a uma constante formação de ânions $O_2^{\cdot-}$ nas mitocôndrias. Estima-se que 5% do oxigênio respirado tem esse tipo de conversão. Já no processo de fagocitose existe uma intensa produção de EROs,e dentre elas destaca-se também o ânion superóxido, formado através da enzima NADPH-oxidase e, posteriormente, esse ânion é transformado em H_2O_2 pela SOD. O peróxido de hidrogênio pode ser transformado em hipoclorito (ClO^-) – potente agente bactericida – pela ação da enzima mieloperoxidase; outro destino metabólico do H_2O_2 é a formação do radical hidroxila através da reação de Fenton (que ocorre na presença de metal de transição).

O metabolismo do ácido araquidônico vincula-se diretamente ao processo inflamatório. Esse ácido pode ser transformado em prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs) por meio das isoenzimas da ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2); outra rota metabólica do ácido araquidônico é a formação de leucotrienos por ação da lipo-oxigenase. Ambos os processos metabólicos geram EROs. Estudos recentes indicam que o peroxinitrito favorece a formação de tromboxanos, diminuindo a formação de prostaciclinas, concomitantemente, esses dois fenômenos favorecem a formação de trombos.

Entre as fontes exógenas de radicais livres destacam-se as radiações, os agrotóxicos, o cigarro, os solventes orgânicos e alguns fármacos. Considera-se como radiação mais nociva a do tipo γ, pois ela é capaz de provocar a radiólise da água formando o radical hidroxila. Esse radical, por ser muito instável, reage diretamente com os lipídios das membranas celulares provocando o rompimento das cadeias carbônicas e levando à formação de moléculas polares entre as quais se destacam os aldeídos, álcoois e ácidos de pequena cadeia carbônica, processo denominado peroxidação lipídica.

Outro tipo de radiação que merece especial atenção pela população humana é a radiação ultravioleta do tipo A, a qual é capaz de provocar a fusão de bases nitrogenadas do DNA, levando a mutações que aceleram o processo de envelhecimento cutâneo, podendo inclusive provocar câncer de pele. A exposição excessiva à radiação solar em populações de baixa pigmentação faz com que os melanomas sejam um dos tipos de câncer de maior incidência no Brasil.

Sistemas antioxidantes

Vários são os mecanismos celulares que existem contra os processos vinculados aos radicais livres, podendo ser divididos em: sistemas de defesas enzimáticos e não enzimáticos. As células também contam com sistemas de defesa celular que procuram reparar os danos provocados pelos radicais livres.

Entre as defesas enzimáticas destacamos a enzima superóxido dismutase, pois ela catalisa a transformação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. Na atualidade, já se conhecem três isoenzimas da SOD: SOD-1(CuZnSOD), SOD-2(MnSOD) e SOD-3(ECSOD). Outra enzima importante nesse processo antioxidante é a catalase (CAT) por transformar H_2O_2 em água (H_2O), ela localiza-se em diversos tecidos do organismo. Também a enzima glutation-peroxidase (GPx) é capaz de converter o H_2O_2 em H_2O em presença do glutation (GSH) que, nesta reação, se comporta como um doador de hidrogênios; essa mesma enzima também pode transformar hidroperóxido (R-OOH) em álcoois com o auxílio do GSH, formando glutation-oxidado (GSSG).

As defesas não enzimáticas podem ser obtidas através da alimentação, por meio da vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferois), carotenoides e flavonoides. Essas moléculas, em geral, apresentam, em suas estruturas, grupamentos hidroxilas que facilmente reagem com as EROs, evitando que essas espécies ataquem as membranas, proteínas e ácidos nucleicos celulares. Um dos maiores desafios dos pesquisadores desta área é a determinação da quantidade necessária, em cada indivíduo, para a ação antioxidante efetiva dessas substâncias não enzimáticas.

A Figura 11.2 mostra um resumo esquemático a respeito das espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e algumas enzimas relacionadas à formação dessas espécies e mecanismos antioxidantes.

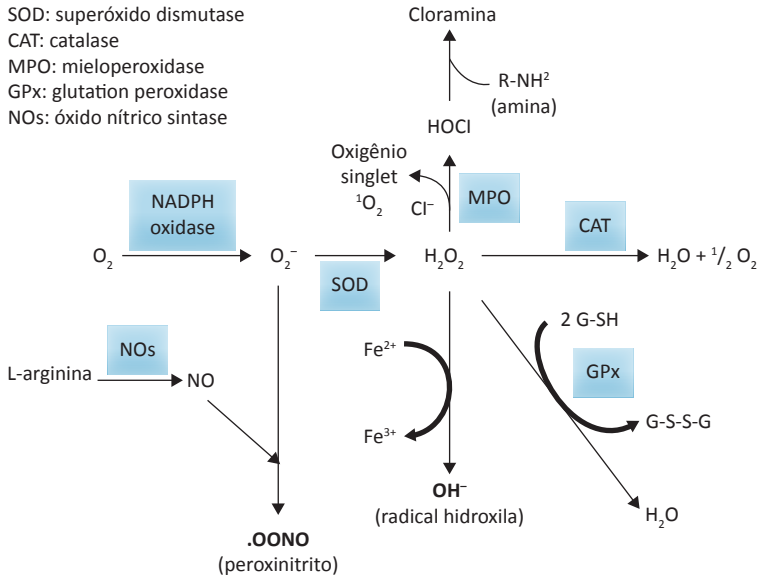


Figura 11.2 Espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e algumas enzimas relacionadas à formação dessas espécies e mecanismos antioxidantes.
Fonte: Adaptada de Fukai & Ushio-Fukai (2011).

Estresse oxidativo

O termo estresse oxidativo se refere a situações em que existe um aumento permanente na geração de radicais livres, sejam de origem endógena ou exógena, levando a uma redução significativa da capacidade antioxidante. Frequentemente, ambos os mecanismos ocorrem de forma simultânea.

Doenças relacionadas ao estresse oxidativo

Muitos estudos demonstram o importante papel entre o estresse oxidativo e o surgimento de patologias como diabetes, aterosclerose, neoplasias e doenças neurodegenerativas, dentre outras.

Diabetes Mellitus (DM)

O DM caracteriza-se por um desequilíbrio no metabolismo dos carboidratos, das proteínas e dos lipídios. Pode revelar-se como decorrente das seguintes etiopatogenias: DM tipo 1 (autoimune ou idiopático), DM tipo 2 (por resistência à insulina, obesidade, e história familiar), DM gestacional, Lada (*latente autoimune diabetes in adults* – diabetes autoimune latente do adulto), Mody (*maturity onset diabetes of the young* – diabetes monogenética de traço autossômico dominante), DM provocado por drogas ou DM secundário a doença pancreática.

Estudos demonstram relação entre estresse oxidativo e diabetes. Marcadores de peroxidação lipídica foram observados no plasma de pacientes com DM tipo 1 compensados. Além disso, a β-oxidação que se apresenta elevada nos diabéticos pode contribuir na formação de EROs nas mitocôndrias e também nos peroxissomos, onde se forma o H_2O_2.

Aterosclerose

É uma doença que acomete as artérias de grande e médio calibres, promovendo alterações na camada íntima pelo acúmulo de células de músculo liso, lipídios e macrófagos. Primeiramente, há uma infiltração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na região subendotelial; a molécula de LDL sofre oxidação no local, liberando citocinas e inibindo a formação do NO, dando início ao processo inflamatório. Os macrófagos (*scavenger*) captam o LDL oxidado originando as células espumosas, e essas, posteriormente, constituirão as estrias de gordura. As citocinas além de atrair os monócitos – precursores dos macrófagos – também induzem a proliferação e a migração para a camada íntima de células de músculo liso, que darão sustentação à placa de ateroma através do depósito de colágeno e outras moléculas da matriz.

A maioria das placas de aterosclerose encontra-se nas bifurcações, zonas de maior atrito do sangue contra as paredes do vaso, levando aos danos endoteliais que deixam essa área predisposta a maior infiltração das LDLs e, assim, à formação das placas de ateroma. Uma vez que esse processo é contínuo nessas áreas, posteriormente também haverá pressão sobre as placas e estas podem romper, levando à formação de trombos e, consequentemente, às embolias ou até mesmo ao óbito. Quanto maiores os níveis plasmáticos das LDLs, maior será o processo de entrada destes na camada íntima dos vasos.

Neoplasias

A neoplasia é resultado de alterações progressivas na função da célula, a qual promove aumento no potencial proliferativo, invasivo e metastático, sendo assim, características distintivas do câncer. Podem ocorrer tanto por alterações mutacionais no DNA celular quanto por alterações epigenéticas (modificam a expressão gênica e o comportamento celular e são transmitidos para células-filhas), que podem ser advindas da hipermetilação da região promotora de um gene, por exemplo.

Há décadas, evidências vêm sendo demonstradas a respeito da ação dos radicais livres sobre o DNA e como podem ocasionar diferentes tipos de danos levando às neoplasias. Observou-se em diversos estudos que nas células cancerosas havia grande quantidade de EROs ou de seus produtos após o dano oxidativo ao DNA. Foi demonstrado, também, que o radical hidroxila é capaz de alterar a posição de qualquer base nitrogenada; já os radicais livres com menor poder reativo agem principalmente sobre a guanina. Além dos danos diretos ao DNA, a peroxidação lipídica pode também ter potencial mutagênico, entretanto, os danos oxidativos isolados não podem ser considerados marcadores tumorais, uma vez que podem ser insuficientes para causar o câncer ou, ainda, devam atingir um nível determinado somando-se a outros fatores para desencadear a formação das células tumorais.

Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas mais comuns na atualidade são o Alzheimer e o Parkinson. Isso se deve ao aumento da expectativa de vida populacional, entretanto ainda necessitamos conhecer mais sobre a fisiopatologia desses processos degenerativos para assim limitar a progressão e controlar esses males. Uma vez que o cérebro necessita de grandes quantidades de oxigênio, ele está mais suscetível ao estresse oxidativo; o metabolismo dos neurotransmissores, como a dopamina e o glutamato também são fontes de EROs ($^1O_2$ e H_2O_2, principalmente) consumindo rapidamente as substâncias antioxidantes que são pequenas em algumas áreas cerebrais.

As membranas celulares dos neurônios possuem altos níveis de lipídios poli-insaturados propensos a sofrer peroxidação lipídica. Há, ainda, células constituintes da glia como a micróglia e macrófagos fixos do sistema nervoso central (SNC), que produzem EROs como catabólitos. A oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas origina aldeídos, tais como: propanal, butanal, pentanal, hexanal e 4-didroxi-2-transnonenal (4-HNE); há indícios de que o 4-HNE induz à apoptose, sugerindo-nos que essa molécula é um mediador no estresse oxidativo e no dano neuronal. No Alzheimer há evidências sugerindo que os radicais livres levariam a uma neurotoxicidade, contribuindo no processo de formação dos peptídios β-amiloides (responsáveis pela formação das placas senis características do quadro). Já no Parkinson, a degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra poderia ser devido à presença elevada de íons ferro, nesses pa-

cientes, promovendo mais geração de EROs através da reação de Fenton e, dessa forma, levando ao dano neuronal.

TEORIAS SISTÊMICAS

O processo de envelhecimento, apesar de ser natural, evidente e comum a todos os seres vivos, é pouco esclarecido. Uma série de hipóteses e teorias foram propostas para explicar o envelhecimento biológico. Em 1990, Medvedev catalogou mais de trezentas "teorias", e muitas delas se complementam, outras divergem quanto ao mecanismo de senescência, porém, todas compartilham a ideia de degeneração da função sistêmica e celular, e consequente perda funcional e morte.

Atualmente, dois paradigmas principais norteiam as pesquisas sobre o envelhecimento biológico: os processos estocásticos (como mutação genética aleatória e estresse oxidativo) e senescência programada (eventos sequenciais, estruturados e programados).

As teorias programadas consistem em uma sequência de fenômenos biológicos que regulam o crescimento, a maturidade sexual, a senescência e a morte, diferindo das teorias estocásticas que são baseadas em alterações celulares de forma aleatória e progressiva. Na atualidade, sabemos que o envelhecimento envolve processos estocásticos e sistêmicos, dependendo da carga genética, do meio ambiente e da qualidade de vida de cada indivíduo.

As teorias sistêmicas postulam que o envelhecimento é decorrente de eventos sequenciais, programados e coordenados, advindos de uma cascata sistêmica de interações entre os genes e o ambiente.

O perfeito funcionamento dos sistemas fisiológicos do organismo é fundamental para sua sobrevivência. Os sistemas nervoso, endócrino e imune desempenham papel importante no ajuste homeostático do ser humano, adequando o grau de resposta a estímulos intrínsecos, extrínsecos e de defesa. Temos, assim, duas teorias sistêmicas importantes a serem abordadas: Teoria sistêmica neuroendócrina e neuroendócrina-imunológica. Essas consideram que defeitos na regulação das funções desses sistemas estão relacionados ao envelhecimento.

Teoria neuroendócrina

Propõe que modificações na função dos sistemas neural e endócrino ocasionam envelhecimento. As funções neuroendócrinas são fundamentais para a coordenação das respostas do corpo aos estímulos externos, bem como a manutenção de um estado ótimo para reprodução e sobrevivência. As mudanças nessa função influenciam também as funções que controlam a sobrevivência por adaptação ao estresse e funções evolutivas como: reprodução, crescimento e desenvolvimento. Assim, postula-se que o tempo de vida (*life span*) é regulado por "relógios biológicos" influenciados e controlados sequencialmente pelos sinais neuroendócrinos.

Um importante conceito dessa teoria é de que o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) funciona como um "marcapasso" da homeostase interna. Sendo a diminuição da capacidade de resposta ao estresse, uma causa importante para o envelhecimento.

O termo estresse foi definido por Hans Selye, em 1949, como sendo uma reação não específica do organismo após um estímulo nocivo. Atualmente, o termo estresse é utilizado para caracterizar as respostas adaptativas, sejam elas físicas, mentais ou emocionais, diante de estímulos capazes de alterar a homeostase do indivíduo, possibilitando a sobrevivência sobre situações ameaçadoras. Quando uma situação ameaçadora ocorre, o sistema nervoso central processa as informações sensoriais externas – se essa é julgada como potencialmente nociva – então uma cascata de respostas neurais, hormonais e comportamentais será iniciada. A mente e o corpo humano respondem ao estresse, um estado de ameaça à homeostase, ativando o sistema simpático e secretando catecolaminas na resposta "luta ou fuga". A resposta ao estresse é geralmente transiente porque os seus efeitos (por exemplo, inibição do crescimento de imunossupressão, e catabolismo aumentado) podem ser prejudiciais a longo prazo. Quando crônica, a resposta ao estresse pode ser associada à doença, tais como úlceras pépticas e distúrbios cardiovasculares. Estudos epidemiológicos indicam fortemente que o estresse crônico conduz a danos no DNA e ao envelhecimento.

O córtex cerebral, sistema límbico e formação reticular relacionam-se com o hipotálamo (Figura 11.3), que regula várias funções como: as viscerais da divisão simpática e parassimpática, as comportamentais – medo, fome e atividade sexual –, e as endócrinas, como síntese de hormônios reguladores hipofisários, vasopressina e ocitocina. A hipófise responde ao controle hipofisário para regular respostas de es-

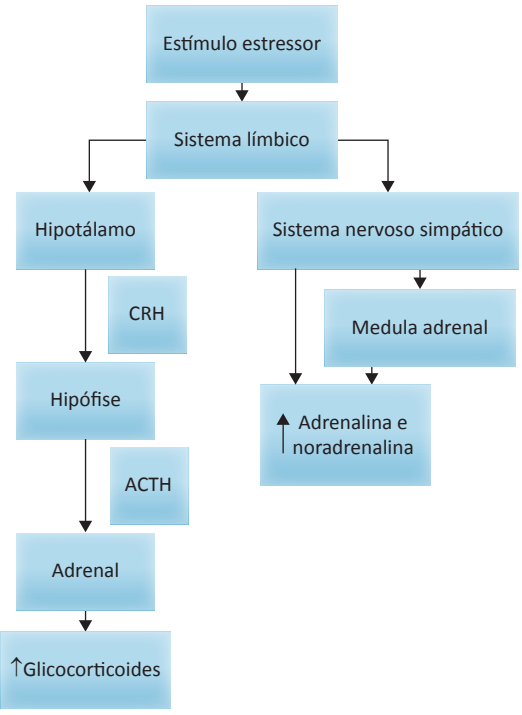


Figura 11.3 Resposta ao estresse.
Fonte: Adaptada de Tano & Marcondes (2002).

tresse como ajuste da pressão arterial e na utilização de substratos energéticos. A glândula adrenal ou suprarrenal produz, em sua porção medular, por estímulo simpático, adrenalina e noradrenalina ou catecolaminas, neurotransmisorres importantes para a regulação das situações de estresse.

A duração dos estímulos estressores é rápida (aguda) ou longa (crônica). O estresse agudo pode ocorrer por um estímulo que dura por um período de poucos minutos a poucas horas, e por poucos dias, enquanto o estresse crônico é definido como um estímulo que persiste por muitas horas e alguns dias, ou um estímulo que ocorre por poucas horas diariamente, mas com duração de muitos dias.

A elevação nos níveis de glicocorticoides mantida por longo período, no estresse duradouro ou crônico, pode ter efeitos negativos no organismo, com a ocorrência de alterações na expressão gênica no SNC, redução da função do sistema catecolaminérgico, inibição da atividade da tireoide, da secreção do hormônio do crescimento e interrupção do ciclo reprodutivo.

Na atualidade, sabe-se que os níveis sanguíneos de glicocorticoides alteram-se à medida em que envelhecemos. Geralmente esses níveis aumentam, o que provoca alterações em nível de hipotálamo e hipocampo e, por conseguinte, modificações no sistema de controle do eixo HHA.

Os hormônios do córtex adrenal têm ação nas características sexuais secundárias, os glicocorticoides regulam o metabolismo de gorduras, proteínas e carboidratos, e os mineralocorticoides regulam os conteúdos de água e eletrólitos no organismo. Os níveis sanguíneos de glicocorticoides e os hormônios sexuais são regulados por mecanismos de *feedback* negativo e positivo. Esse controle se dá pela regulação hipotalâmica e hipofisária. Com o envelhecimento e a exposição ao estresse crônico, não só o controle por *feedback* pode estar desajustado, mas também os níveis elevados de glicocorticoides podem ser tóxicos às células neurais, prejudicando ainda mais esse controle e caracterizando a senescência.

Dando suporte à teoria neuroendócrina, temos ainda dados que relacionam o controle metabólico, mediado pela insulina e IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1),* com o estresse e longevidade em organismos primitivos.

Teoria neuroendócrina-imunológica

Em todas as etapas da vida, o controle multissistêmico das funções corporais está sobre importante influência da integração entre o sistema neuroendócrino e o sistema imune. Essa interação ocorre: pelo compartilhamento de sinalizadores como citocinas e neuropeptídeos presentes em ambos os sistemas e que agem na intercomunicação desses, também por ação de hormônios hipofisários e hipotalâmicos que regulam funções imunitárias como, principalmente, o controle do cortisol, que diminui a resposta imunitária. A interleucina-1 (IL-1) também é uma citocina com função recíproca, pois ativa o eixo HHA e pode agir na liberação de outros hormônios hipofisários como TSH (hormônio estimulante da tireoide), GH (hormônio do crescimento), prolactina e hormônio luteinizante.

Além da função neuroendócrina, a função primordial do sistema imune é a de combater agentes externos através das células (defesa celular), que combatem diretamente o invasor, tais como: macrófagos, neutrófilos e linfócitos T, e produzir anticorpos (defesa humoral) contra esses invasores. No idoso, um quadro de imunosenescência é caracterizado por diminuição da resistência contra patógenos que causam infecções, diminuição de defesa contra o câncer, e aumento do risco de desenvolvimento de doenças autoimunes.

O timo, importante órgão do sistema imunológico – pois seleciona e matura os linfócitos T e produz hormônios peptídicos – está reduzido em tamanho e função no idoso. Porém, outras funções como, por exemplo, a atividade dos linfócitos e do sistema de complemento está preservada em idosos saudáveis, e isso demonstra um grau de plasticidade, ou seja, a capacidade de modificar a sua função de acordo com a demanda do sistema imune, apesar da plasticidade dos sistemas neuroendócrino e imune ser mais eficiente nos jovens.

SEMIOLOGIA

O atendimento ao paciente idoso requer atenção, principalmente quanto aos aspectos psicossociais e aos problemas típicos da idade avançada, uma vez que quando não são manejados adequadamente levam essa população a ter maior tempo de internação hospitalar e consequente redução de sua capacidade funcional, determinando muitas vezes recidivas frequentes. A superposição de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT), manifestadas de forma sindrômica são chamadas de síndromes geriátricas, as quais podem incluir alterações sensitivas, depressão, estado confusional agudo, dificuldades de mobilidade, quedas, incontinência de esfíncteres, desnutrição, consequências iatrogênicas, déficit cognitivo e presença de pluripatologia. As Síndromes Geriátricas são popularmente conhecidas no meio científico como os "5 is" do idoso: instabilidade postural, imobilidade, incontinência urinária ou fecal, iatrogenia e insuficiência cerebral, sendo que, atualmente, foram adicionados os "3 ds", que são a depressão, o *delirium* e a demência.

Os aspectos que devemos ter em mente no atendimento ao idoso:

- apresentação das doenças, por serem atípicas devido à perda de homeostase do organismo;
- sintomas iniciais que podem aparecer de forma branda e/ou precoce;
- surgimento simultâneo de múltiplas comorbidades;
- achados anormais nos exames que são relativamente comuns e podem não ser responsáveis por sintomas particulares;
- parcimônia com os sintomas analisados no idoso por serem, em sua maioria, de múltiplas causas;
- abordagem ideal requer mais tratamentos dos sistemas orgânicos associados à doença do que o combate aos sistemas que mostram essas manifestações.

Exame físico

O idoso necessita de um exame físico completo, que avalie todos os aparelhos orgânicos, incluindo o exame pélvico nas mulheres, e um exame retal em ambos os sexos. O peso e a pressão arterial postural devem ser aferidos em todas as visitas,

merecendo cuidados constantes. Importante avaliar, também, acuidade visual e auditiva, examinar a correta adaptação de próteses dentárias e inspecionar com cuidado a cavidade oral após a remoção destas, atentando para possíveis lesões malignas.

Existem, ainda, instrumentos específicos para Avaliação Geriátrica Ampla (AGA), os quais reúnem um conjunto de técnicas, ambiente operacional e procedimentos para proporcionar uma avaliação abrangente e estruturada da independência e integridade cognitiva do indivíduo, baseada em métodos clássicos no âmbito de diversas especialidades. São esses instrumentos: Atividades Básicas de Vida Diária (ABVD); Atividades Instrumentais da Vida Diária (AIVD); Miniexame do Estado Mental (MEEM); Desenho do Relógio; Teste de Fluência Verbal por Categorias Semânticas; Escala de Depressão Geriátrica, dentre outros indicados no Caderno de Atenção Básica nº 19 do Ministério da Saúde.

Exames

A investigação clínica no idoso não difere da dos demais pacientes, embora a interpretação dos achados em exames laboratoriais é que apresentará parâmetros diferenciados. Temos de ser mais criteriosos e sempre expandir as possibilidades diagnósticas, uma vez que o quadro clínico apresenta-se de maneira distinta da clássica em várias patologias que acometem essa população.

O envelhecimento promove uma perda progressiva de células e da função dos tecidos, levando o organismo a uma menor aptidão para se regenerar e sobreviver. O prejuízo funcional é heterogêneo entre os sistemas e evidencia-se por meio da menor capacidade das reservas em restaurar a homeostase sob estresse e, posteriormente, a função é também alterada no repouso.

Não conhecemos ainda claramente quais os mecanismos que desencadeiam o envelhecimento. Sabe-se que ele é multifatorial, e as evidências apontam para o acúmulo de uma série de mudanças bioquímicas. Essas alterações comprometeriam a função dos ácidos nucleicos, proteínas e membranas lipídicas, e incluiriam a oxidação por radicais livres, glicação não enzimática, mudanças epigenéticas como a metilação do DNA e a acetilação de histonas.

Para tanto, em termos de exames, recomenda-se ao paciente idoso realizar periodicamente, de acordo com as particularidades de cada caso:

- **Hemograma:** auxilia na detecção de anemias e leucemias.
- **Determinação laboratorial de creatinina e ureia:** exames muito importantes para avaliar a função renal.
- **Determinação laboratorial de transaminases (TGO e TGP):** exames muito importantes para avaliar a função hepática.
- **Determinação laboratorial de glicemia:** exame muito importante para avaliar o metabolismo dos carboidratos. Deve ser realizado com frequência, principalmente se houver histórico familiar ou sintomas de diabetes.
- **Determinação laboratorial de colesterol e triglicerídeos:** exames muito importantes para avaliar o metabolismo dos lipídios. Deve ser realizado com frequência, principalmente se houver histórico familiar de diabetes, hipertensão ou mesmo se o paciente for fumante.
- **Determinação laboratorial de TSH (hormônio estimulante da tireoide):** este hormônio participa diretamente na regulação da produção dos hormônios tireoidianos T3 e T4.
- **Determinação laboratorial de vitaminas B12, D e ácido fólico:** Tais vitaminas são fundamentais no metabolismo e frequentemente estão alteradas no paciente idoso.
- **Densitometria óssea:** exame realizado para avaliar a osteoporose (quando o paciente apresenta fatores de risco).
- **Exame da próstata:** para diagnosticar o câncer de próstata são necessários três exames: o toque retal, a dosagem de PSA (antígeno prostático-específico) e a ultrassonografia transretal com biópsia.
- **Mamografia:** auxilia na detecção do câncer de mama.
- **Colonoscopia:** pode auxiliar na detecção precoce do câncer de intestino. A pesquisa de sangue oculto nas fezes também contribui na detecção de alguns tipos de cânceres no intestino grosso.
- **Teste ergométrico:** mensura a capacidade cardíaca e auxilia na detecção de doenças cardiovasculares.

Exames laboratoriais para avaliar estresse oxidativo

Praticamente todas as determinações laboratoriais para avaliar radicais livres, antioxidantes e estresse oxidativo são, na atualidade, apenas realizadas em laboratórios de pesquisa. Dentre esses exames laboratoriais podemos citar:

1. Determinação da enzima superóxido dismutase (SOD);
2. Determinação da enzima óxido nítrico sintase (NOS);
3. Determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
4. Determinação de proteína carbonil;
5. Determinação da enzima catalase (CAT);
6. Determinação de peróxidos totais;
7. Determinação de glutationa;
8. Ensaio cometa;
9. Determinação da capacidade antioxidante total.

PATOLOGIAS

À medida em que envelhecemos, a homeostasia celular e orgânica altera-se e passamos a ter uma situação denominada homeostenose, sendo verificadas importantes alterações em nível cognitivo, bioquímico e fisiológico. Na senilidade podemos ter o aparecimento de diversas doenças, dentre as quais destacam-se:

Hipertensão

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é caracterizada quando o indivíduo apresenta níveis médios de pressão arterial (PA) que conferem um significativo aumento no risco de eventos cardiovasculares, a curto ou longo prazos, justificando uma intervenção terapêutica. Pacientes com valores de pressão arterial sistêmica ≥ 140 × 90 mmHg são considerados hipertensos.

A HAS é uma doença que envolve diversos fatores, tais como: distúrbios renais que modificam a regulação da volemia, com alteração da excreção de íons e metabólicos; fatores neurais que podem desregular os barorreceptores, levando à sobrecarga adrenérgica, consequente vasoconstrição periféri-

ca e aumento no reflexo da ação do eixo renina-angiotensina-aldosterona; fatores vasculares, como a disfunção endotelial, ocasionando uma rigidez de artérias e arteríolas; fatores genéticos ligados à excreção renal de sódio, por exemplo; fatores ambientais como obesidade, tabagismo, sedentarismo e elevado consumo de sódio; fatores humorais, os quais levam ao aumento da produção de vasoconstritores e à diminuição das secreções de prostaciclinas, NO e peptídios natriuréticos.

O principal fator que deve ser avaliado no paciente hipertenso é o risco cardiovascular. Existem escores específicos que se propõem em estimar o perigo da ocorrência de doença cardiovascular (DCV) nos próximos dez anos, por exemplo, frente aos hábitos e características do paciente. Os fatores de risco avaliados nos diversos escores disponíveis na literatura são: tabagismo, etilismo, sedentarismo, dislipidemias (TGA > 150 mg/dL; LDL > 100 mg/dL; HDL < 40 mg/dL), intolerância à glicose, *Diabetes mellitus*, nefropatia, microalbuminúria, hiperuricemia, Proteína C-reativa (PCR) aumentada, história familiar prematura de DCV (♂ < 55 anos e ♀ < 65 anos), circunferência abdominal aumentada, relação cintura/quadril aumentada, índice de massa corporal (IMC) ≥ 30 kg/m^2, idade (♂ > 55 anos ♀ > 65 anos).

O diagnóstico de hipertensão é dado com duas medições durante o atendimento médico, em consultas distintas, mantendo-se o cuidado de o paciente não ter ingerido café ou álcool 30 minutos antes, ter fumado há pouco tempo, ter realizado atividade física moderada/intensa de 60 a 90 minutos antes da aferição, e estar com a bexiga vazia. Deve-se, também, nas primeiras consultas, aferir a pressão em ambos os braços e sempre tomar por base a de maior valor para o diagnóstico. Conforme a classificação do estágio de hipertensão, medidas mais rígidas devem ser tomadas para o controle da PA. É muito importante avaliar também possíveis lesões em órgãos-alvo, uma vez que a HAS é uma doença silenciosa e já pode ter comprometido retina, rins e coração, por exemplo.

Como exames complementares para a avaliação da HAS são solicitados, laboratorialmente: glicemia de jejum, perfil lipídico, creatinina sérica, potássio sérico, ácido úrico, microalbuminúria e proteinúria (em amostra de urina ou urina de 24 horas), eletrocardiograma de repouso e raio X de tórax.

O objetivo terapêutico é manter o paciente sem comorbidades simultâneas à PA < 140 × 90 mmHg. Entretanto, nos pacientes com 60 anos de idade ou mais, o alvo muda para PA < 150 × 90 mmHg. Em todos os casos é recomendada a mudança no estilo de vida e, nos casos em que a pressão for maior que 160 × 100 mmHg já deve-se iniciar terapia com o uso de dois fármacos de diferentes classes.

Doença de Alzheimer

Dentre as alterações psiquiátricas e neurológicas que se observa em alguns pacientes idosos, destacam-se a depressão e a demência. No Brasil, a demência pode alcançar a taxa de 13,8 por 1.000 habitantes/ano, dentre os idosos. Em nosso país, a depressão atinge mais de 14% dos idosos. A Doença de Alzheimer aumenta muito a partir da sexta década de vida, podendo atingir mais de 40% dos indivíduos acima dos 90 anos.

Com relação à Doença de Alzheimer, especificamente, muitos pontos nebulosos ainda existem, mesmo após mais de cem anos de sua descrição pelo psiquiatra Alois Alzheimer, em 1907, e todas essas dúvidas merecem mais investigações a respeito, pelo fato de essa patologia, atualmente, atemorizar milhões de idosos que passam a perceber o processo de envelhecimento como uma potencial ameaça.

O aumento da incidência de Alzheimer representa um enorme desafio para os sistemas de saúde, por tratar-se de uma patologia crônica e progressiva, caracterizada, principalmente, pelo declínio da memória recente e, também, de outras funções cognitivas decorrentes da depleção da acetilcolina nos núcleos basais de Meynert e da atrofia do lobo temporal. Nos estágios mais avançados, também podem estar presentes alterações no equilíbrio dinâmico e estático. Vejamos na Tabela 11.1 os principais sinais e sintomas presentes nas diferentes fases da doença.

Tabela 11.1 Sinais e sintomas da Doença de Alzheimer.

Fase inicial	Fase intermediária	Fase grave
Lapsos na memória recente	Perda de memória intensificada	Comprometimento da deambulação e da fala
Mudanças de comportamento	Não reconhecimento de pessoas e objetos	Infecções recorrentes
Senso de direção comprometido	Maior dependência física	Não reconhece ninguém nem a si próprio
Dificuldade para fixar novas informações	Repetição de informações	Dependência física total
Atitude mais agressiva	Agressividade intensifica-se	Surgimento de úlceras de pressão e problemas de circulação
Teimosia	Alternância de lucidez e confusão mental Esquecimento de palavras cotidianas Alteração no equilíbrio	Deglutição prejudicada

Fonte: Adaptada de Machado JC.; 2011.

Além da idade avançada, o histórico familiar, alterações na pressão arterial, *Diabetes mellitus*, traumatismo cranioencefálico e trissomia do cromossomo 21 são alguns dos principais fatores de risco para a Doença de Alzheimer. Embora alguns desses fatores não sejam possíveis de modificar, há evidências científicas mostrando que a atividade física regular de intensidade moderada a alta resulta no aprimoramento da memória e na melhora da plasticidade cerebral, reduzindo o estresse oxidativo e, portanto, diminuindo a incidência de Alzheimer.

A estimulação cognitiva também tem demonstrado relevante parcela de contribuição, reduzindo o risco de demência, pois atua na plasticidade neuronal cerebral melhorando a memória, a atenção, o raciocínio e a resolução de problemas. O importante é estar precoce e constantemente engajado em atividades que proporcionem ao cérebro novas experiências, seja por meio de jogos intelectuais, leituras, descoberta de novas habilidades ou mesmo intensificando o convívio social em grupos diversificados.

Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) ou Mal de Parkinson, descrita pela primeira vez por James Parkinson, em 1817, pode apresentar diversas etiologias, porém a prevalência da DP de origem idiopática aumenta cerca de dez vezes na população acima dos 60 anos idade, sendo a segunda doença neurodegenerativa mais comum nessa faixa etária, com prevalência estimada de 3,3% no Brasil. Caracteriza-se pela destruição de neurônios dopaminérgicos localizados na substância negra, provoca um quadro clínico de acinesia (incapacidade na iniciação do movimento ou retardo no tempo de reação) ou bradicinesia (lentidão no movimento), tremor, instabilidade postural e rigidez. Tradicionalmente é diagnosticada pelos sinais motores, contudo, são frequentes sinais e sintomas não motores, tais como disfunção autonômica e cognitiva, podendo ser tão incapacitantes quanto os sintomas motores e provocando severos problemas aos pacientes e cuidadores.

Clinicamente, além da tétrade clássica da DP, outras manifestações podem ser observadas à medida que a doença progride, como dificuldade de concentração, aprendizado e memória, compreensão, perda da expressão facial, distúrbios sensoriais, retenção urinária, salivação, disfunção sexual, distúrbio de esvaziamento gástrico, perda de peso e alteração do sono. A disfagia também é frequente, porém, nem sempre está associada à severidade da Doença de Parkinson.

Dentre as alterações cognitivas, a demência associada ao Mal de Parkinson é a manifestação mais severa. Aumenta o risco de morte, pois, assim como outras manifestações neuropsiquiátricas relacionadas a essa patologia, compromete seriamente a qualidade de vida do idoso.

A fisiopatologia da demência associada à Doença de Parkinson ainda não está completamente elucidada. Entretanto, uma consequência importante da demência é a restrição quanto ao uso de drogas antiparkinsonianas, visto que são muito mais propensas a provocar efeitos colaterais neuropsiquiátricos. Deste modo, o tratamento medicamentoso do quadro demencial na DP envolve uma rigorosa seleção dos antiparkinsonianos administrados, evitando-se, principalmente, o uso de fármacos com ação anticolinérgica. Alguns estudos a respeito do efeito de drogas de ação colinérgica utilizadas no tratamento da doença de Alzheimer (como rivastigmina, donezepil e galantamina) têm demonstrado resultados bastante favoráveis sobre as alterações cognitivas da Doença de Parkinson, sem provocar comprometimentos negativos no quadro motor. A droga memantina, antagonista do receptor de glutamato, também se mostra adequada para o tratamento da demência associada à DP.

Embora a DP seja uma disfunção progressiva, é possível amenizar certos sintomas que proporcionam melhor qualidade de vida ao paciente. Para tanto, o tratamento fisioterapêutico responsabiliza-se pela manutenção da força muscular, da coordenação motora e do equilíbrio, principalmente. Ademais, o paciente com DP que se encontra acamado está, geralmente, propenso a infecções respiratórias e, nesses casos, a fisioterapia atua diretamente na manutenção da higiene brônquica e na realização de exercícios respiratórios reexpansivos. Sabe-se que a Doença de Parkinson fragiliza o idoso e o predispõe a outras patologias, requer diversas adaptações cotidianas e compromete a capacidade funcional do indivíduo. Dessa forma, por tratar-se de uma doença neurodegenerativa, o prognóstico não é positivo.

Incontinência urinária

De acordo com a *International Continence Society,* incontinência urinária (IU) é definida como a perda involuntária de urina, sendo considerada um problema social ou higiênico. A perda urinária provoca desconforto e perda de autoconfiança, podendo ocasionar infecções urinárias ou mesmo dermatoses de períneo.

A prevalência de IU é maior nas mulheres, variando de 8% a 34% na população idosa, e atinge de 30% a 60% dos idosos institucionalizados. Dentre os fatores de risco destacam-se: sobrepeso, medicações, cirurgias que são capazes de provocar a diminuição do tônus muscular pélvico, parto vaginal, história de histerectomia, queda dos níveis de estrogênio na menopausa e constipação.

A IU pode ser classificada em incontinência urinária de esforço (IUE), incontinência urinária de urgência (IUU) e incontinência urinária mista (IUM). A IUE é caracterizada pela perda involuntária de urina, secundária a algum tipo de esforço, como tossir ou correr; a IUU é a perda involuntária de urina associada a um desejo súbito de urinar, podendo ocorrer espontaneamente ou ser desencadeada por situações de perigo ou mudança súbita de temperatura; já a IUM pode estar associada a ambas as situações, e também ser decorrente de aspectos emocionais.

Uma vez detectado o quadro de incontinência, pode-se verificar a necessidade de um procedimento cirúrgico. No entanto, a fisioterapia tem demonstrado excelentes resultados, em alguns casos, cercando-se de recursos que promovem o restabelecimento da musculatura do assoalho pélvico de forma eficiente e funcional a fim de melhorar a qualidade de vida das pacientes.

Osteomusculares

A prevalência de incapacidade e dependência funcional é alta em idosos e está intimamente associada à redução da massa muscular ou sarcopenia. Estima-se que, a partir dos 40 anos de idade, ocorra perda de cerca de 5% de massa muscular a cada década, com declínio mais rápido após os 65 anos, particularmente nos membros inferiores. As fibras do tipo I (aeróbias, de contração lenta) parecem ser resistentes à atrofia associada ao envelhecimento, pelo menos até os 70 anos de idade, enquanto a área relativa às fibras do tipo II (anaeróbias, de contração rápida) declina de 20% a 50% com o passar dos anos.

A perda de densidade óssea é característica da senescência e mais exacerbada no sexo feminino. A partir da quarta década de vida inicia-se lentamente uma perda óssea, com predomínio da reabsorção óssea sobre a formação. A perda óssea em uma mulher dos 30 aos 90 anos de idade é de, aproximadamente, 45%. No homem, a perda óssea relacionada à idade é linear e pode alcançar um decréscimo em torno de 20% em relação ao pico de massa óssea que é atingido por volta dos 30 anos de idade. A remodelagem é caracterizada por atividade equilibrada de reabsorção (atividade dos osteoclastos) e formação óssea (atividade dos osteoblastos). Com a idade ocorre um desacoplamento desses processos e a reabsorção passa a superar a formação óssea. Isso pode estar ligado a uma deficiente formação ou a uma atividade aumentada dos osteoclastos. Os mecanismos implicados são diferentes em função do sexo, da idade e do estado hormonal.

A sarcopenia associada à osteopenia forma uma combinação perigosa ao idoso, já que a perda de massa muscular aumenta o risco de quedas, enquanto a perda de massa óssea aumenta o risco de fraturas. Cerca de 30% dos idosos caem anualmente, e dessas quedas 5% causam fraturas. No idoso instala-se um ciclo vicioso de diminuição da força muscular e do equilíbrio, com aumento do risco de quedas, o que pode gerar insegurança ao deambular, ocasionando diminuição de atividade e aumento de perda óssea e muscular.

POLIMEDICAÇÃO

A preocupação com o uso racional de medicamentos e a polimedicação é um assunto que merece especial cuidado, principalmente em relação aos idosos, visto que, com o passar dos anos, há diminuição da massa muscular, da água corporal e, ainda, redução do metabolismo em nível hepático, sendo que os mecanismos homeostáticos e a capacidade de filtração e de excreção renal também podem ser comprometidos. Em virtude desses fatores fisiológicos, há uma dificuldade na eliminação e na metabolização dos fármacos, resultando em um acúmulo de substâncias tóxicas no organismo e, consequentemente, provocando alguns efeitos adversos.

A polimedicação refere-se ao uso simultâneo e crônico de múltiplos fármacos. Para caracterizar a cronicidade, alguns autores definem como períodos não inferiores a três meses enquanto outros aceitam o período de uma semana, classificada como polimedicação menor (variando entre dois a quatro fármacos), e polimedicação maior (uso de cinco ou mais fármacos). Os idosos chegam a constituir 50% dos multiusuários de medicamentos, fato este que ocorre devido à maior prevalência de doenças crônico-degenerativas nessa faixa etária.

O uso de vários medicamentos propicia o risco no aumento de problemas relacionados com medicamentos, sendo estes vinculados à farmacoterapia, o que pode interferir nos resultados esperados de saúde do paciente. Quando o paciente apresenta mais de três situações que caracterizem risco de possuir problemas relacionados com medicamentos, o mesmo deve ser avaliado minuciosamente. Dentre essas situações, destacam-se: utilizar cinco ou mais medicamentos ao dia, administrar 12 ou mais doses diárias, realizar tratamento farmacológico para três ou mais problemas de saúde, utilizar medicamentos considerados de baixo grau terapêutico (medicamentos cuja dose terapêutica é próxima da dose tolerada), possuir quatro ou mais alterações no último ano das instruções de uso dos medicamentos.

Estudos evidenciam que ser do sexo feminino, possuir baixo grau de escolaridade e elevado número de procura por serviços de saúde no último ano são fatores significantes quando se avalia a polimedicação em idosos. As patologias que mais contribuem para a polimedicação são as cardiovasculares, endócrinas e neurológicas, enquanto as classes de medicamentos que mais se destacam são os anti-hipertensivos, antidiabéticos, psicotrópicos e antitrombóticos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A multifatorialidade associada ao processo de envelhecimento torna complexo tal fenômeno e, portanto, é fundamental que os profissionais de saúde, bem como os próprios idosos, seus familiares e cuidadores tenham uma visão integrada desses fatores.

Alguns agravos podem estar direta ou indiretamente relacionados ao avanço da idade, influenciando negativamente na qualidade de vida e, em especial, com relação à capacidade funcional comprometendo, inclusive, as mais simples atividades de vida diária dos idosos.

Muitas vezes o processo de envelhecimento não permite o completo bem-estar dos indivíduos, porém sabe-se que, com um planejamento precoce dessa fase da vida, levando em consideração o estilo de vida, uma alimentação saudável e atividades físicas e mentais regulares é possível conquistar longevidade e saúde, permitindo o equilíbrio para se viver com qualidade.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, et al. Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson's disease: an 8-year prospective study. Arch Neurol. 2003b;60(3):387-92.
2. Aarsland D, Hutchinson M, Larsen JP. Cognitive, psychiatric and motor response to galantamine in Parkinson's disease with dementia. Int J Geriatr Psychiatry. 2003a;18(10):937-41.

3. Aarsland D, Laake K, Larsen JP, et al. Donepezil for cognitive impairment in Parkinson's disease: a randomised controlled study. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2002;72:708-12.
4. Abrams P, Cardoso L, Fall M, et al. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of International Continence Society. Urology. 2003;61(1):37-49.
5. American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2009;32(suppl1):S62-7.
6. Antunes MV, Lazzaretti C, Gamaro GD, et al. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4 dinitrofenilhidrazina. Rev Bras Cienc Farm. 2008;44(2):279-87.
7. Bacelar R. Envelhecimento e produtividade: Processos de subjetivação. Recife: Fundação Antônio dos Santos Abranches – FASA, 1999.
8. Baptista RR, Vaz MA. Arquitetura muscular e envelhecimento: adaptação funcional e aspectos clínicos: revisão da literatura. Fisioterap Pesq. 2009;16(4):368-73.
9. Barbosa MT, Caramelli P, Maia DP, et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambui study). Mov Disord. 2006;21(6):800-8.
10. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Quim Nova. 2006;29(1):113-26.
11. Belleville S. Cognitive training for person with mild cognitive impairment. Int Psychogeriatr. 2008;20(1):57-66.
12. Bengtson VL, Silverstein M, Putney NM, et al. Handbook of Theories of Aging. Springer Phublishing Company. 2.ed. New York: Springer Publishing Company, 2009. p.43.
13. Bickley LS. Bates: Propedêutica Médica Essencial – Avaliação Clínica, Anamnese, Exame Físico. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
14. BRASIL. Ministério da Saúde. Caderno de Atenção Básica nº 19 – Ministério da Saúde – Envelhecimento e saúde da pessoa idosa. 2007. [Internet] [Acesso 31 mar 2017]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abcad19.pdf
15. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil. 2011. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf
16. Buckingham JC. Effects of stress on glucocorticoids. In: Fink G. Encyclopedia of Stress. New York: Academic Press, 2000. p.229-38.
17. Bullock R, Cameron A. Rivastigmine for the treatment of dementia and visual hallucinations associated with Parkinson's disease. Curr Med Res Opin. 2002;18(5):258-64.
18. Caixeta L. Doença de Alzheimer. Porto Alegre: Artmed, 2012. p.504.
19. Campos-Souza IS, Campos-Souza RN, Ataíde Jr L, et al. Executive dysfunction and motor symptoms in Parkinson's disease. Arq Neuropsiquiatr. 2010;68(2):246-51.
20. Cavalcanti AH, Muxfeldt ES. Ambulatório de Clínica Médica: Experiência do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – UFRJ. Rio de Janeiro: Revinter, 2011. p.725.
21. Charchat-Fichman H, Caramelli P. Koichi Sameshima, 1 Ricardo Nitrini, 1 Declínio da capacidade cognitiva durante o envelhecimento. Rev Bras Psiquiatr. 2005;27(12):79-82.
22. Dalman MF, Bhatnagar S, Viau V. Hypothalamo-pituitary-adrenal axis. In: Fink G. Encyclopedia of Stress. New York: Academic Press, 2000. p.468-77.
23. De Lau LM, Schipper CM, Hofman A, et al. Prognosis of Parkinson disease: risk of dementia and mortality: the Rotterdam Study. Arch NeuroI. 2005;68(2):1265-9.
24. Dhabhar FS. Stress-induced Enhancement of Immune Function. In: Fink G. Encyclopedia of stress. New York: Academic Press, 2000. p.515-23.
25. Duarte YAO. Desempenho funcional e demandas assistenciais. In: Lebrão ML, Duarte YAO. O Projeto SABE no Município de São Paulo: uma abordagem inicial. Brasília: Organização Pan-Americana de Saúde/ Ministério da Saúde, 2003. p.185-200.
26. Dumoulin C, Hay-Smith J. Pelvic floor muscle training versus no treatment for urinary incontinence in women. A Cochrane systematic review. Eur J Phys Rehabil Med. 2008;44(1):47-63.
27. Emre M. Dementia in Parkinson's disease: cause and treatment. Curr Opin Neurol. 2004;17(4):399-404.
28. Emre M. What Causes mental dysfunction in Parkinson's disease? Mov Disord. 2003;18(Suppl):S63-S71.
29. Farinati PTV. Teorias Biológicas do Envelhecimento: do genético ao estocástico. Rev Bras Med Esporte. 2002;8(4):129-38.
30. Ferin M. Effects of stress on gonadotropin secretion. In: Fink G. Encyclopedia of stress. New York: Academic Press, 2000. p.283-9.
31. Figueiredo EM, Lara JO, Cruz MC, et al. Perfil sociodemográfico e clínico de usuárias de serviço de fisioterapia uroginecológica da rede pública. Rev Bras Fisioter. 2008;12(2):136-42.
32. Flores LM, Mengue SS. Uso de medicamentos por idosos em região do sul do Brasil. Rev Saude Publica. 2005;39(6):924-9.
33. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. Antioxid Redox Signal. 2011;15(6):1583-606.
34. Galato D, Silva ES, Tiburcio LS. Estudo de utilização de medicamentos em idosos residentes em uma cidade do sul de Santa Catarina (Brasil): um olhar sobre a polimedicação. Cienc Saude Colet. 2010;15(6):2899-905.
35. Garbellini D. Fisioterapia aplicada aos idosos portadores de disfunções neurológicas. In: Rebelatto JR, Morelli JGS. Fisioterapia geriátrica: a prática da assistência ao idoso. 2.ed. Barueri: Manole, 2007. p.237-70.
36. Gasparim AZ, Jurkiewicz AL, Marques JM, et al. Deglutição e tosse nos diferentes graus da doença de Parkinson. Arq Int Otorrinolaringol. 2011;15(2):181-8.
37. Gavrilov LA, Gavrilova NS. Evolutionary Theories of Aging and Longevity. ScientificWorldJournal. 2002;2:339-56.
38. Gil del Valle L. Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans. Biomedicine Aging Pathol. 2010;1(1):1-7.
39. Guo T, Wei L, Sun J, et al. Antioxidant activities of extract and fractions from Tuber indicum Cooke & Massee. Food Chem. 2011; 127(4):1634-40.
40. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. Ann N Y Acad Sci. 2000;899:136-47.
41. Haase DCBV, Machado DC, Oliveira JGD. Atuação da fisioterapia no paciente com Doença de Parkinson. Fisioter Mov. 2008;21(1):79-85.
42. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4.ed. New York: Oxford, 2007. p.851.

43. Hara MR, Kovacs JJ, Whalen EJ, et al. A stress response pathway regulates DNA damage through β2-adrenoreceptors and β–-arrestin-1. Nature. 2011;477(7364):349-53.
44. Hayflick L. Como e por que envelhecemos. Rio de Janeiro: Campus, 1997.
45. Hernandez SSS, Coelho FGM, Gobbi S, et al. Efeitos de um programa de atividade física nas funções cognitivas, equilíbrio e risco de quedas em idosos com demência de Alzheimer. Rev Bras Fisioter. 2010;14(1):68-74.
46. James PA, Oparil S, Carter BL, et al. 2014 Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults: Report From the Panel Members Appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). JAMA. 2014;311(5):507-20.
47. Jeckel Neto EA, Cunha GL. Tratado de Gerontologia e Geriatria. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.13-9.
48. Kato EM, Radanovic M, Smid J, et al. Evaluation of the balance control in Alzheimer disease. Arq Neuropsiquiatr. 2005;63(2):S110.
49. Kurita A, Ochiai Y, Kono Y, et al. The beneficial effect of donepezil on visual hallucinations in three patients with Parkinson's disease. J Geriatr Psychiatry Neurol. 2003;16(3):184-8.
50. Langford BJ, Jorgenson D, Kwan D, et al. Implementation of a self-administered questionnaire to identify patients at risk for medication related problems in a family health center. Pharmacotherapy. 2006;26(2):260-8.
51. Lebrão ML. O envelhecimento no Brasil: aspectos da transição demográfica e epidemiológica. Saúde Coletiva. 2007;4(17):135-40.
52. Lerma EV, Berns JS, Nissenson AR. CURRENT Diagnóstico e Tratamento: Nefrologia e Hipertensão. Porto Alegre: AMGH, 2011. p.588.
53. Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl contento of oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 1990;186:464-78.
54. Litvinenko IV, Odinak M, Mogilnaya VI, et al. Therapy by memantine in demented patients with Parkinson's disease improves cognitive functions and preserves of motors functional abilities for 30 months period. Europ J Neurology. 2005;Suppl.122:111.
55. Lustri WR, Morelli JGS. Aspectos biológicos do envelhecimento. In: Rebelatto JR, Morelli JGS. Fisioterapia geriátrica: a prática da assistência ao idoso. 2.ed. Barueri: Manole, 2007. p.37-84.
56. Machado JC. Doença de Alzheimer. In: Freitas EV, PY L (ed.). Tratado de Geriatria e Gerontologia. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p.179-201.
57. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem. 1974;47(3):469-74.
58. Martinez CAR, Cordeiro AT, Priolli DG, et al. Avaliação da Expressão Tecidual do Gene de Reparo MLH1 e dos Níveis de Dano Oxidativo ao DNA em Doentes com Câncer Colorretal. Rev Bras Coloproct. 2009;29(3):303-13.
59. Mcphee SJ, Ganong WF. Fisiopatologia da Doença: uma Introdução à Medicina Clínica. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 2007.
60. Medvedev Z. An attempt at a rational classificatoin of theories of ageing. Biol Rev Camb Philos Soc. 1990;65(3):375-98.
61. Meireles AE, Pereira LMS, Oliveira TG, et al. Alterações neurológicas fisiológicas ao envelhecimento afetam o sistema mantenedor do equilíbrio. Rev Neurocienc. 2010;18(1):103-8.
62. Melo LM, Barbosa ER, Caramelli P. Declínio cognitivo e demência associados à Doença de Parkinson: características clínicas e tratamento. Rev Psiq Clin. 2007;34(4):176-83.
63. Meneses MS, Teive HAG. Doença de Parkinson. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
64. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. FASEB J. 2004;18(15):1791-800.
65. Moreira RO, Moura F, Benchimol A, et al. Endocrinologia Geriátrica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p.262.
66. Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H2O2 solutions in the UV). Anal Biochem. 1972;49(2):474-8.
67. Netto, FLM. Aspectos biológicos e fisiológicos do envelhecimento humano e suas implicações na saúde do idoso. Pensar a prática. 2006;7(1):75-84. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/fef/article/view/67>
68. Nitrini R, Caramelli P, Herrera Júnior E, et al. Performance of illiterate and literate nondemented elderly subjects two tests of long-term memory. J Int Neuropsychol Soc. 2004;10(4):634-8.
69. Nóbrega TC, Jaluul O, Machado AN, et al. Quality of life and multimorbidity of elderly outpatients. Clinics. 2009; 64(1):45-50.
70. Oliveira JR, Garcia RR. Cinesioterapia no tratamento da incontinência urinária em mulheres idosas. Rev Bras Geriatr Gerontol. 2011;14(2):343-51.
71. Paixão Jr CM, Reichenheim ME. Uma revisão sobre instrumentos de avaliação do estado funcional do idoso. Cad Saude Publica. 2005;21(1):7-19.
72. Papanicolaou S, Hunskaar S, Lose G, et al. Assessment of bothersomeness and impact on quality of life of urinary incontinence in women in France, Germany, Spain and the UK. BJU Int. 2005;96(6):831-8.
73. Paschoal SMP, Franco RP, Salles RFN. Epidemiologia do Envelhecimento. In: Netto MP. Tratado de Gerontologia. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. p.39-56.
74. Paschoal SMP. Qualidade de vida na velhice. In: Freitas EV, Py L, Néri AL, et al. Tratado de geriatria e gerontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.79-84.
75. Patel RB. Polypharmacy and the elderly. J Infus Nurs. 2003;26(3):166-9.
76. Penteado PTPS, Cunico C, Oliveira KS, et al. O uso de medicamentos por idosos. Visão Acadêmica. 2002;3(1):35-42.
77. Pereira ALF, Vidal TF, Constant PBL. Dietary antioxidants: chemical and biological importance. Nutrire Rev Soc Bras Alim Nutr. 2009;34(3):231-47.
78. Petersen RC, Jack CR, Xu JC, et al. Memory and MRI-based hipocampal volumes in aging and AD. Neurology. 2000;54(3):581-7.
79. Porto CC. Semiologia Médica. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
80. Ramalho AC, Lazaretti-Castro M. Fisiopatologia da Osteoporose Involutiva. Arq Bras Endocrinol Metab. 1999;43(6):409-14.
81. Ravina B, Putt M, Siderowf A, et al. Donepezil for dementia in Parkinson's disease: a randomised, double blind, placebo controlled, crossover study. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2005;76(7):934-9.
82. Rayman MP. Selenium and human health. Lancet. 2012;379(9822):1256-68.

83. Rodrigues NC, Rauth J, Terra NL. Gerontologia social para leigos. 2.ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2010. p.112.
84. Rodrigues RAP, Scudeller PG, Pedrazzi EC, et al. Morbidade e sua interferência na capacidade funcional de idosos. Acta Paul Enferm. 2008;21(4):643-8.
85. Rodrigues SM, LeDoux JE, Sapolsky RM. The Influence of Stress hormones on fear circuitry. Annu Rev Neurosci. 2009;32:289-313.
86. Rozenfeld S. Prevalência, fatores associados e mau uso de medicamentos entre idosos: uma revisão. Cad Saude Publica. 2003;19(3):717-24.
87. Santin R, Fonseca VF, Bleil CB, et al. Olfactory function and Parkinson's disease in Southern Brazil. Arq Neuropsiquiatr. 2010;68(2):252-57.
88. Santos FH, Andrade VM, Bueno OFA. Envelhecimento: um processo multifatorial. Psicol Estudo. 2009;14(1):3-10.
89. Santos JLF. Análise da sobrevida sem incapacidades. In: Lebrão ML, Duarte YAO. O projeto SABE (Saúde, Bem-estar e Envelhecimento) no município de São Paulo: uma abordagem inicial. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde/ Ministério da Saúde, 2003. p.167-81.
90. Santos TRAS, Lima DM, Nakatani AYK, et ak. Consumo de medicamentos por idosos, Goiânia, Brasil. Rev Saude Publica. 2013;47(1):94-103.
91. Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, et al. Physical activity, diet and risk of Alzheimer disease. JAMA. 2009;302(6):627-37.
92. Schwanke CHA, Gomes I, Pedro REL, et al. Atualizações em Geriatria e Gerontologia II – abordagens multidimensionais e interdisciplinares. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2009. p.134.
93. Selye H, Fortier C. Adaptative reactions to stress. Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis. 1949;(29):3-18.
94. Silva TAA, Junior AF, Pinheiro MM, et al. Sarcopenia Associada ao Envelhecimento: Aspectos Etiológicos e Opções Terapêuticas. Rev Bras Reumatol. 2006;46(6):391-7.
95. Steinbrenner H, Sies H. Protection against reactive oxygen species by seleno-proteins. Biochim Biophys Acta. 2009; 1790:1478-85.
96. Tanno AP, Marcondes FK. Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas. Rev Bras Cienc Farm. 2002;38(3):273-89.
97. Teixeira INDO, Guariento ME. Biologia do Envelhecimento: Teorias, Mecanismps e Perspectivas. Cienc Saude Colet. 2010;15(6):2845-57.
98. Teixeira INDO, NeriI AL. Envelhecimento bem-sucedido: uma meta no curso da vida. Psicol USP. [online]. 2008;19(1):81-94. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: <http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678--51772008000100010&lng=pt&nrm=iso>
99. Terada S, Ishizu H, Ishiguro K, et al. Exon 3 insert of tau protein in neurodegenerative disease. Acta Neuropatol. 2005;110(1):12-8.
100. U.S. Department of Health and Human Services. The Seventh Report of the Joint Nacional Committe on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure – 2004. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/hypertension/jnc7full.pdf
101. United Nations, New York. Departament of Economic and Social Affairs. World Population Aging. 2009. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.un.org/esa/population/publications/WPA2009/WPA2009_WorkingPaper.pdf
102. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. Quim Nova. 2007;30(5):1323-38.
103. Veehof L, Stewart R, Haaijer-Ruskamp B, et al. The development of polypharmacy: a longitudinal study. Fam Pract. 2000;17(3):261-7.
104. Wagg A, Potter J, Peel P, et al. National audit of continence care for older people: management of urinary incontinence. Age Ageing. 2008;37(1):39-44.
105. Weinert B, Timiras P. Invited review: theories of aging. J Appl Physiol. 2003;95:1706-16.
106. Weinert B, Timiras P. Physiology of aging. Invented Review: Theories of aging. J Appl Physical. 2003;95:1706-16.
107. World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: Report of a WHO/IDF consultation. Geneva: WHO, 2006.
108. World Health Organization. Older people: a new power of development. 2012. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.who.int/ageing/events/idop_rationale/en/
109. Yen LH, Chou H. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects o furaria crinita root. Food Chemistry. 2001;74(4):471-8.

12

capítulo

Amadeo Sáez-Alquézar

Fígado, Enzimas e Proteínas Plasmáticas

INTRODUÇÃO

Em geral, os testes laboratoriais empregados no estudo das hepatopatias refletem aspectos específicos de comprometimento do fígado.

Os testes bioquímicos mais utilizados para o estudo do fígado são as bilirrubinas, as proteínas séricas e algumas enzimas. Esses testes podem ser usados na triagem para detectar ou excluir alterações hepáticas, para ajudar no diagnóstico das hepatopatias ou para acompanhamento da evolução, com ou sem tratamento, das doenças hepáticas.

Algumas vezes, esses testes são chamados, incorretamente, de testes de função hepática, mas na verdade eles não avaliam efetivamente o estado global da função hepática com exceção, talvez, da albumina, do tempo de protrombina e da pseudocolinesterase, que podem indicar diminuição na capacidade de síntese pelo parênquima hepático.

Provas para a avaliação da função do fígado baseadas no clareamento plasmático de substâncias exógenas, pelo fígado, têm sido utilizadas em trabalhos de investigação e também na prática clínica para a escolha do tempo certo para indicação de transplantes ortotópicos de fígado e para prever a sobrevida em casos de doença hepática grave.

No presente capítulo apresentaremos uma descrição atualizada sobre os testes bioquímicos para estudo do fígado e das provas de função hepática mais comumente empregadas.

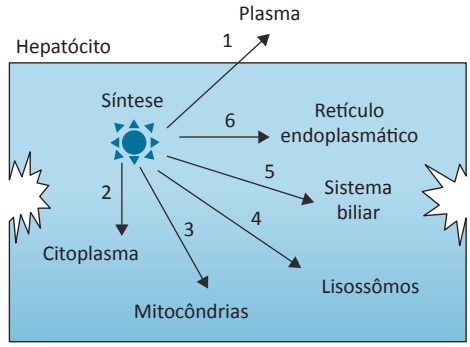
NÍVEIS SÉRICOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Enzimas são compostos orgânicos de natureza proteica, que catalisam reações químicas dentro ou fora das células, com especificidade variável. A substância transformada pela ação catalítica de uma enzima é chamada substrato, e a substância ou as substâncias produzidas, produto(s) de reação. Algumas enzimas são altamente específicas e agem apenas sobre um determinado substrato (ex.: urease), ao passo que outras, menos específicas, catalisam reações análogas, atuando sobre diferentes substratos (ex.: fosfatase alcalina).

A atividade enzimática é influenciada por diversos fatores, de tal forma que cada enzima possui pH e temperatura ótimos, onde ocorre a maior atividade. Fixadas as variáveis ideais de pH e temperatura, a velocidade de uma reação enzimática depende da concentração do substrato e da ausência de inibidores. Se bem que, *in vitro,* seja importante trabalhar com velocidade máxima de reação, *in vivo*, em condições fisiológicas, a maioria das reações químicas, mediadas por enzimas, processa-se com velocidades inferiores à velocidade máxima.

FUNDAMENTOS FISIOPATOLÓGICOS DO DIAGNÓSTICO ENZIMÁTICO

As enzimas podem ser classificadas em intra e extracelulares (Figura 12.1), de acordo com o local onde exerçam sua atividade biológica. A pseudocolinesterase é um exemplo de enzima extracelular; após a síntese nos ribossomos dos hepatócitos é lançada no sangue circulante exercendo aí sua função biológica (Figura 12.1). A queda dos níveis séricos de atividade dessa enzima reflete diminuição na capacidade de síntese pelo parênquima hepático ou da massa hepática funcionante.



1: Enzimas extracelulares (ChE)
2-6: Enzimas intracelulares
2: ALT, AST, DHL, GDS
3: AST, GIDH
4: Hidrolases ácidas
5: FA, GGT
6: GGT

Figura 12.1 Síntese e localização das enzimas utilizadas para o estudo das hepatopatias.
Fonte: Sáez-Alquézar A., 2006.

Enzimas intracelulares diferenciam-se quanto à localização no interior das células. Após a síntese, distribuem-se no citoplasma ou nas diferentes organelas citoplasmáticas, participando dos processos metabólicos (Figura 12.1). A atividade dessas enzimas no interior das células é de 10 mil a 100 mil vezes maior do que no plasma, onde em condições normais ocorrem em níveis muito baixos.

Alterações estruturais devido a dano direto nas membranas das células, lesões traumáticas ou mudanças de pressão, bem como aporte insuficiente de oxigênio e substratos por alterações da circulação sanguínea ou modificações do próprio metabolismo, são diferentes causas que podem provocar a liberação de enzimas intracelulares, aumentando assim os níveis séricos de atividade.

Quando ocorrem alterações de permeabilidade celular, a liberação das enzimas intracelulares depende:

a) Do tipo, da intensidade e duração da agressão: a agressão ao fígado causada por agentes diversos tais como vírus, toxinas ou venenos promove respostas diferentes. Essas respostas também vão depender da quantidade do agente agressor e do tempo de ação sobre as células.
b) Da concentração de enzimas no tecido afetado: quanto maior a concentração intracelular de enzimas, maior será a quantidade liberada. A avaliação dos níveis séricos de atividade das enzimas chamadas organoespecíficas, ou seja, presentes em grandes concentrações, apenas em determinados tecidos, podem fornecer dados importantes para o diagnóstico, como acontece com a amilase em relação ao pâncreas, e com a alanina aminotransferase (ALT) em relação ao fígado.
c) Da localização intracelular: inicialmente são liberadas as enzimas de localização citoplasmática, vindo a seguir aquelas de localização mitocondrial e, finalmente, as de localização lisossômica (Figura 12.1). No fígado, enzimas ligadas à fração microssomal ou ao sistema biliar geralmente são liberadas para o espaço extracelular, em casos de indução microssomal (ação do álcool ou de drogas) ou quando há comprometimento do sistema biliar (Figura 12.1).
d) Da capacidade de recuperação para a síntese do tecido afetado: quando as lesões são reversíveis permitem a continuidade da produção de enzimas. Quando as alterações são irreversíveis incapacitam os processos de síntese de enzimas. Neste último caso, ainda que persista o mesmo tipo de agressão, com a mesma intensidade, a liberação de enzimas intracelulares diminuirá gradativa ou drasticamente, como ocorre em casos de necrose submaciça na hepatite fulminante.
e) Do peso molecular das enzimas: os pesos moleculares das enzimas conhecidas oscila entre 12.700 dáltons da ribonuclease e 1 milhão de dáltons da desidrogenase glutâmica. Existe uma relação inversamente proporcional entre velocidade de liberação e peso molecular das enzimas. Por outro lado, a velocidade de eliminação de cada enzima presente no plasma é uma constante biológica para cada espécie (vida média). Em outras palavras, a velocidade de eliminação não depende do valor absoluto do nível sérico de atividade, mas segue uma lei exponencial definida. Cada enzima possui meia-vida própria. Dessa forma, sendo constante a saída de enzimas do plasma, o nível plasmático real depende apenas do aporte e reflete a localização, a extensão, a intensidade e o tipo da agressão celular.

ASPECTOS GERAIS

No caso particular do fígado, alguns aspectos devem ser levados em consideração:

1. O fígado é um órgão que desempenha papel fundamental no metabolismo intermediário e possui um conteúdo extremamente rico em enzimas. Os hepatócitos estão em contato direto com o plasma, de forma que a liberação de enzimas intracelulares ocasiona, de imediato, alterações dos níveis séricos de atividade enzimática.
2. Não só a localização intracelular das enzimas é importante, mas também as diferenças qualitativas nas diferentes zonas do órgão. Ocorre maior atividade da alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamiltransferase (GGT) nas áreas periportais, e maior concentração da desidrogenase glutâmica (GlDH) nas áreas centrilobulares. Por exemplo, comparando-se os níveis séricos de atividade da ALT e da GlDH na hepatite aguda por vírus e na congestão passiva aguda do fígado, só nesta última situação se observam alterações da GlDH.
3. Os níveis séricos de atividade enzimática nos processos inflamatórios do fígado devem-se principalmente à alteração da permeabilidade celular.
4. O aumento dos níveis séricos de atividade enzimática não é proporcional à gravidade da perturbação em cada célula. Assim, na hepatite aguda por vírus a lesão celular é ligeira, porém extensa (a maioria das células está comprometida), e de evolução rápida. Isso leva a um acentuado aumento dos níveis séricos de atividade das enzimas de localização citoplasmática: ALT e AST. Em casos de envenenamento por fungos, a lesão celular é grave, extensa e de evolução rápida, o que leva ao aumento dos níveis séricos de atividade, não só das enzimas citoplasmáticas, mas também das de localização mitocontrial (GlDH) e lisossômica (hidrolases ácidas). Na cirrose hepática, a lesão celular é grave, porém de pequena extensão e de evolução lenta, o que leva a discreto aumento dos níveis séricos de atividade das aminotransferases, especialmente da AST. Na icterícia obstrutiva, a lesão celular é grave, de pequena extensão e evolução rápida. Neste caso, o aumento dos níveis séricos de atividade da ALT e da AST geralmente é discreto, predominando o aumento dos níveis séricos das enzimas chamadas de indicadores de colestase: FA e GGT.

5. Existem diversas metodologias para a determinação dos níveis séricos de atividade das enzimas de importância clínica. Os valores normais para cada método geralmente correspondem à média ± 2 desvios-padrão, em U/L, dos valores encontrados numa população de indivíduos considerados normais. Como os valores normais podem variar entre os métodos utilizados, consideramos apropriado descrever as alterações observadas como o número de vezes que corresponde ao limite superior normal (N × LSN). Por exemplo, empregando um método para detecção da atividade sérica da ALT, com valores considerados normais até 41 U/L, um resultado de 410 U/L será expresso como 10 × LSN.

PERFIL ENZIMÁTICO PARA AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO HEPÁTICO

No Quadro 12.1 são listadas as enzimas utilizadas rotineiramente na prática médica para o diagnóstico e acompanhamento das hepatopatias. Outras enzimas, pouco utilizadas na prática, podem ser bastante úteis em trabalhos de investigação, como por exemplo a desidrogenase glutâmica (GlDH), pseudocolinesterase (ChE) e a 5'-Nucleotidase (5'N).

Quadro 12.1 Enzimas mais utilizadas na prática médica para diagnóstico e acompanhamento das hepatopatias.

Enzima	Sigla
Alanina aminotransferase Antigamente: *Transaminase glutâmico-pirúvica* (TGP)	ALT
Aspartato aminotransferase Antigamente: *Transaminase glutâmico-oxalacética* (TGO)	AST
Fosfatase alcalina	FA
Gamaglutamiltransferase	GGT

Fonte: Sáez-Alquézar A., 2006.

Aminotransferases: Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST)

A ALT é uma enzima intracelular de localização exclusivamente citoplasmática. Ocorre em maior concentração no fígado e em quantidades menores nos rins, no miocárdio e na musculatura esquelética, mas é considerado um marcador bastante específico de dano ao parênquima hepático.

A AST é uma enzima de localização citoplasmática (AST-1 70%) e mitocontrial (AST-2 30%). Ocorre em maior concentração no miocárdio e no fígado, e em menor quantidade no músculo esquelético, nos rins e no pâncreas.

O aumento dos níveis séricos de atividade das aminotransferases entre 15 a 100 vezes o limite superior normal é uma característica da fase aguda das hepatites (A, B, C, D, E), e em geral os níveis de ALT excedem os de AST. Fato semelhante ocorre na fase aguda das hepatites pelo vírus Epstein-Barr (EBV) e citomegalovírus (CMV).

A velocidade de desaparecimento plasmático da AST é maior que o da ALT, de tal forma que após três semanas do início da hepatite, apenas 10% dos casos mostram níveis normais de ALT, contra 40% da AST.

Nos casos de necrose hepática maciça (hepatite fulminante), inicialmente os níveis de ALT e AST estão muito aumentados, mas como a lesão dos hepatócitos, nessa patologia, é irreversível, eles podem cair rapidamente para níveis discretos ou normais.

Em pacientes anictéricos com hepatite aguda por vírus, os níveis séricos das aminotransferases também estão aumentados.

Nas hepatites tóxicas, por envenenamento, os níveis das aminotransferases podem atingir valores muito elevados (> 100 × LSN).

Em 80% dos casos de mononucleose infecciosa (EBV), ocorre aumento dos níveis de ALT e AST de até 15 × LSN, com normalização em torno da quinta semana da doença.

Nas hepatites crônicas pelos vírus B e C observa-se aumento discreto das aminotransferases (< 5 × LSN), com predominância da ALT. Esses aumentos podem apresentar flutuações no decorrer da evolução da doença.

Alguns autores consideram que o índice AST/ALT nas hepatites crônicas e na cirrose hepática aumenta à medida que piora a capacidade funcional hepática.

Nas hepatites alcoólicas o índice AST/ALT costuma ser de aproximadamente 2:1, e o aumento dos níveis da AST raramente ultrapassa 10 × LSN.

Nos casos de esteatose hepática ou infiltração gordurosa do fígado, com ou sem processo inflamatório associado, os níveis séricos das aminotransferases tendem a estar discretamente aumentados (< 5 × LSN)

Na hemocromatose hereditária os níveis séricos da ALT e AST mostram-se discretamente aumentados (< 5 × LSN).

Níveis séricos de atividade das aminotransferases discretamente aumentados (< 5 × LSN) também estão presentes nas hepatites crônicas autoimunes, na doença de Wilson, em casos de deficiência de α 1- antitripsina e na doença celíaca.

Na esteatose hepática não alcoólica os NSA das aminotransferases poderão estar normais ou discretamente aumentados. O mesmo ocorre na esteatose hepática alcoólica.

Na cirrose hepática os níveis de ALT e AST em geral estão pouco aumentados (< 5 × LSN), com predominância da AST sobre a ALT.

Nas colestases intra-hepáticas e nas obstruções biliares extra-hepáticas os níveis séricos de atividade das aminotransferases raramente ultrapassam 15 × LSN. O índice ALT/GGT geralmente é superior a dois na hepatite por vírus e inferior a dois na icterícia obstrutiva.

Nos tumores hepáticos, primários ou metastáticos, a alteração dos níveis da ALT e AST é discreta, podendo aumentar com a evolução da doença.

Nos casos de congestão hepática por insuficiência cardíaca pode ocorrer aumento importante dos níveis de aminotransferases (> 15 × LSN).

Certos medicamentos, toxinas e drogas ilícitas podem provocar aumento no nível sérico das aminotransferases (Tabela 12.1).

Outros distúrbios não hepáticos podem levar a aumentos discretos das aminotransferases: miopatias, pancreatite, infarto do miocárdio, isquemias (rena, cerebral, pulmonar, de membros), anemias hemolíticas e no pós-operatório.

Na Tabela 12.2 pode ser observado um resumo do aumento dos níveis séricos de atividade da ALT e da AST, em função da etiologia.

Fosfatase Alcalina (FA)

A FA corresponde a um conjunto de enzimas intracelulares que ocorrem no fígado (nas bordas sinusoidais e canaliculares), e também na maioria dos outros tecidos do organismo. No diagnóstico das hepatopatias a FA é considerada uma enzima indicadora de colestase. Devemos levar em consideração que os níveis séricos de atividade da FA também podem estar alterados por causa de isoenzimas presentes no tecido ósseo, no intestino delgado e na placenta. Em condições normais, a FA encontrada no soro é de origem hepática e óssea, sendo que apenas 20% são provenientes do intestino delgado.

Os valores normais dependem do método utilizado pelo laboratório e da idade. Em crianças, na fase de crescimento ósseo, os níveis séricos podem atingir valores até 3 vezes o LSN observado em adultos, devido ao aumento da fração óssea.

Durante a gravidez os níveis séricos da FA começam a aumentar no final do primeiro trimestre (FA de origem placentária) atingindo valores, no terceiro trimestre, de até 2× LSN, que podem permanecer durante várias semanas após o parto.

No estudo das hepatopatias a FA apresenta maiores alterações nas colestases intra e extra-hepáticas. Na colestase extra-hepática (icterícia obstrutiva) e nas colestases induzidas por drogas, os níveis séricos de atividade podem mostrar aumentos de até 10 × LSN.

Na cirrose biliar primária os níveis séricos da FA podem atingir valores muito elevados (15 a 20 × LSN). Nos tumores hepáticos, primários ou metastáticos, os valores da FA podem variar desde normais até 20 × LSN, dependendo do estágio de evolução da doença.

Nas hepatites por vírus ou tóxicas, em geral, observam-se aumentos de até 5 × LSN, que acontecem na fase ictérica da doença.

Nas formas crônicas das hepatites os níveis da FA em geral apresentam-se normais, podendo aumentar com a evolução para formas mais graves, com comprometimento do sistema biliar.

Nos abscessos hepáticos também ocorre aumento dos níveis de FA.

Nas doenças infiltrativas e granulomatosas (amiloidose, sarcoidose, leucemias, tuberculose etc.) podem ocorrer aumentos dos níveis séricos da FA.

Tabela 12.1 Medicamentos, toxinas e drogas ilícitas que provocam aumento dos níveis séricos de atividade das aminotransferases (ALT e AST).

Medicamentos	Toxinas	Drogas ilícitas
Acetaminofen	Tetracloreto de carbono	Esteroides anabolizantes
Alfametildopa	Clorofórmio	Cocaína
Carbamazepina	Dimetilformamida	Ecstasis (MDMA)
Fluconazol	Hidrazina	Phencyciclidina (PCP)
Halothane	2-Nitropropano	
Heparina	Tricloroetileno	
Inibidores da HMG-Co A redutase	Tolueno	
Isoniazida		
Ácido nicotínico		
Nitrofurantoína		
Anti-inflamatórios (não esteroides)		
Fenitoína		
Inibidores da protease		
Sulfonamidas		
Ácido valproico		
Vitamina A		

Fonte: Modificada de AGA, 2002.

Tabela 12.2 Etiologia no aumento dos níveis séricos de atividade da ALT e da AST.

Aumento de até 5 × o limite superior normal	Aumento > que 15 × o limite superior normal
Hepática: predominando a ALT	Hepatite aguda por vírus (A-E, EBV, CMV, herpes)
Hepatite crônica B	Ação medicamentosa/toxinas
Hepatite crônica C	Hepatite isquêmica
Hepatite aguda por vírus (A-E, EBV, CMV)	Hepatites autoimunes
Esteatose	Doença de Wilson
Hemocromatose	Obstrução dos ductos biliares
Ação medicamentosa	Síndrome de Budd-Chiari
Hepatites autoimunes	Ligadura da artéria hepática
Deficiência de α-1-antitripsina	
Doença de Wilson	
Hepática: predominando a AST	
Dano hepático relacionado com álcool	
Esteatose	
Cirrose extra-hepática	
Hemólise	
Miopatias	
Tireoide	
Exercício físico	
Macro-AST	

Fonte: Modificada de AGA, 2002.

Nos tumores intestinais pode ocorrer aumento dos níveis séricos da FA devido ao aumento da fração intestinal da FA.

Em doenças ósseas, os níveis da FA também podem estar aumentados, devido ao aumento da fração óssea da FA.

A determinação das isoenzimas da FA pode ajudar a definir a origem do aumento observado nos níveis séricos de atividade, mas em geral essas metodologias são pouco utilizadas. Uma forma de distinguir entre a origem hepática ou óssea da FA é por seu comportamento ao calor. A FA hepática é mais estável ao aumento da temperatura do que a FA de origem óssea.

Para confirmar a especificidade hepática do aumento nos níveis séricos da FA, podem ser utilizadas outras enzimas, como a gamaglutamiltransferase (GGT) e a 5'nucleotidase (5NT).

A GGT está presente em muitos outros tecidos, além do fígado, mas não está presente no tecido ósseo. A 5NT também está presente em outros tecidos, mas aumentos significativos nos níveis séricos de atividade observam-se unicamente nas hepatopatias com valores muito elevados nos processos colestáticos.

Gamaglutamiltransferase (GGT)

A GGT ocorre no fígado (ductos biliares e fração microssomal) e também em outros tecidos: pâncreas, rim, baço, intestino delgado, próstata, coração, cérebro e glândulas mamárias.

A GGT mostra maiores alterações em processos em que há comprometimento do sistema biliar. Nas doenças que causam obstrução do sistema biliar os níveis séricos da GGT tendem a estar bastante aumentados (> 15 × LSN).

Nas hepatites agudas por vírus os níveis séricos da GGT raramente ultrapassam 6 × LSN, mas nas formas colestáticas das hepatites os aumentos podem ser maiores.

Nas hepatites crônicas, cerca de dois terços dos pacientes mostram níveis de GGT discretamente aumentados, e de FA normais. Com a evolução para formas mais graves da doença, os níveis séricos da GGT e da FA podem apresentar aumentos maiores.

Na cirrose hepática observam-se níveis séricos de GGT desde normais até bastante aumentados, sendo que as maiores alterações ocorrem na cirrose alcoólica e na cirrose biliar primária. Na fase inicial da cirrose biliar primária (colestase em nível dos ductos biliares intra-hepáticos) os níveis séricos da GGT e da FA encontram-se significativamente aumentados. Com a evolução da doença observa-se, também, aumento dos níveis séricos das aminotransferases (ALT e AST).

Na cirrose biliar secundária (forma colestática, congestiva ou mista) os níveis séricos da GGT podem estar desde normais até muito aumentados.

Aumentos importantes na atividade sérica da GGT em pacientes com esteatose, hepatite e cirrose alcoólicas confi-

guram uma indução microssomal do álcool para a produção de GGT. Esse fato é corroborado pelo aumento da GGT sérica, observado durante o tratamento com fenobarbital e pela significativa correlação positiva entre níveis séricos aumentados de GGT e de triglicérides. Devido a essa característica, a GGT tem sido utilizada no seguimento de pacientes com administração prolongada de drogas (ex.: anticonvulsivantes).

Crianças submetidas a tratamento prolongado com aminopirina apresentam aumento dos níveis séricos de GGT.

O consumo constante de bebidas alcoólicas provoca aumento dos níveis séricos de GGT (2 a 3× LSN), que retornam a níveis normais quando cessa a ingestão de álcool.

Nos tumores hepáticos, primários e metastáticos, os níveis da GGT podem estar aumentados (5 a 10 × LSN), dependendo do estágio de evolução da doença.

O comportamento dos níveis séricos da GGT é variável em patologias ou processos extra-hepáticos. Na doença óssea ativa, em tumores intestinais, durante o crescimento e no terceiro trimestre de gravidez, em que os níveis de FA podem estar aumentados, os níveis séricos de atividade da GGT permanecem normais. Nas doenças musculares os níveis de GGT também permanecem normais, porém estão alterados em casos de pancreatite crônica, tumores primários de pâncreas (muito aumentados), doença renal crônica, rejeição de transplantes renais, epilepsia, tumores cerebrais e acidentes cerebrovasculares.

Dos fatos expostos, depreende-se que a GGT é de grande utilidade para distinguir entre doença hepática e óssea, naqueles casos em que os níveis de FA estão aumentados.

Também, a GGT pode substituir a FA para o diagnóstico de hepatopatias em crianças, e em gestantes no terceiro trimestre de gravidez (Tabela 12.3).

Níveis séricos de GGT aumentados também têm sido observados em casos de infarto do miocárdio e em pacientes com diabetes, principalmente quando há comprometimento vascular.

Recursos adicionais para o perfil enzimático nas hepatopatias

Desidrogenase glutâmica (GLDH)

É uma enzima intracelular, de localização mitocondrial, que apresenta maior atividade nas áreas centrolobulares do fígado. Os maiores aumentos dessa enzima ocorrem nos processos em que há maior comprometimento hepatocelular, com grande componente de necrose, e nas afecções que levam a maior comprometimento das áreas centrilobulares.

Nas hepatites fulminantes, quando ocorre queda abrupta das aminotransferases, a GLDH continua a aumentar, indicando o alto grau de necrose.

Nas lesões por halotano verificam-se aumentos acentuados de GLDH, correspondendo a extensas áreas de necrose centrilobular.

Valores normais: Até 4 UI/L (homens); 3 UI/L (mulheres).

5'-Nucleotidase

É uma enzima semelhante à FA, que hidrolisa nucleotídeos.

Observam-se aumentos dos NSA nas doenças hepatobiliares junto com a FA, porém é mais específica, pois não se altera nas doenças ósseas por aumento da atividade osteoblástica, nem durante o crescimento ou durante a gravidez.

Valores normais: até 15 UI/L.

Tabela 12.3 Níveis séricos de atividade enzimática da FA e da GGT nas hepatopatias e em patologias e processos extra-hepáticos.

Hepatopatias	FA	GGT
Doenças colestáticas	Aumentados	Aumentados
Cirrose biliar primária	Aumentados (15 a 20 × LSN)	Aumentados
Hepatite aguda por vírus	Aumentados (> 5 × LSN)	Aumentados (< 10 × LSN)
Tumores hepáticos (primários e metastáticos)	Desde normais até > 10 × LSN	Desde normais até > 10 × LSN
Cirrose hepática	Desde normais até > 10 × LSN	Desde normais até >15 × LSN
Hepatite crônica	Normais	Desde Normais até 3 × LSN
Etiologia alcoólica	Normais ou pouco aumentados	Muito aumentados
Patologias extra-hepáticas		
Doença óssea ativa	Aumentados	Normais
Tumores intestinais	Aumentados	Normais
Rejeição de transplante renal	Normais	Aumentados
Diabetes	Normais	Aumentados
Crianças (durante o crescimento)	Aumentados (até 3 × LSN)	Normais
Gravidez (3º trimestre)	Aumentados (até 2 × LSN)	Normais

Fonte: Modificada de AGA, 2002.

Pseudocolinesterase (ChE)

É uma enzima extracelular, sintetizada no fígado. Processos que condicionam diminuição na capacidade de síntese pelos hepatócitos ou diminuição da massa hepática funcionante (ex.: cirrose), consequentemente, levam à queda dos níveis séricos de atividade da enzima.

Existe certo paralelismo entre o comportamento da ChE e o tempo de protrombina.

Na cirrose hepática os níveis da ChE em geral estão diminuídos, sendo o grau de diminuição representativo da massa hepática comprometida. Alguns autores consideram essa enzima de grande valor prognóstico na evolução da cirrose hepática.

Observam-se, também, níveis séricos diminuídos nas intoxicações, agudas ou crônicas, por inseticidas organofosforados e na terapêutica por ciclofosfamida.

Com a utilização da succinilcolina, como relaxante muscular, verificou-se a presença de variantes genéticas da colinesterase sérica. Normalmente, a succinilcolina é hidrolisada no sangue pela ChE. Indivíduos homozigotos para um gene atípico apresentam níveis séricos muito diminuídos da ChE, e quando tratados com succinilcolina evoluem para relaxamento muscular com apneia prolongada. Os valores normais da ChE são: 1.900 a 3.800 UI/L quando se utiliza a acetilcolina como substrato, e de 3.000 a 9.300 UI/L quando se utiliza a butirilcolina.

Ceruloplasmina (CER)

É sintetizada principalmente no fígado, e é liberada como uma α-2-glicoproteína no plasma, onde exerce a função de transportar ao redor de 90% do cobre plasmático. Os restantes 10% são transportados pela albumina. É uma proteína de fase aguda, que corre na região das α-2-imuneglobulinas e consequentemente poderá estar aumentada em processos inflamatórios.

A ceruloplasmina tem sido usada principalmente para o diagnóstico da doença de Wilson. Nessa doença observa-se uma degeneração hepatolenticular originada por um distúrbio genético, de transmissão autossômica, que provoca alterações no metabolismo do cobre. Essas alterações afetam a síntese da ceruloplasmina, interferindo no transporte do cobre, que passa a se depositar em diversos tecidos do organismo, inicialmente no fígado e posteriormente no cérebro, na córnea (anel de Kayser-Fleisher) e nos rins.

Os valores normais por método nefelométrico são considerados entre 22 e 52 mg/dL. Valores de ceruloplasmina diminuídos, abaixo de 10 mg/dL, são fortemente sugestivos da doença de Wilson, porém um resultado normal de CER não exclui o diagnóstico da doença. Na verdade, ao redor de 28% dos pacientes com a doença apresentam valores de ceruloplasmina normais. Valores baixos de CER também podem ser observados em casos de deficiência nutricional e má-absorção, e também na síndrome nefrótica e síndrome de Menkes.

Durante a gestação e durante o uso de estrógenos (anticoncepcionais) observa-se aumento dos níveis de CER.

PROTEINAS SÉRICAS

O fígado humano desempenha funções importantes no metabolismo proteico quanto à captação de amônia sanguínea e síntese da ureia, ao metabolismo dos aminoácidos e à síntese proteica. O fígado é o principal local de síntese da maioria das proteínas circulantes no organismo. A albumina, que quantitativamente é a proteína mais importante do plasma, é sintetizada exclusivamente no fígado (10 a 15 g/dia). Desta forma, a medida das proteínas séricas é de fundamental importância para o estudo da função hepática.

Os métodos laboratoriais mais empregados para o estudo das proteínas séricas são:

a) Determinação da concentração de proteínas totais.
b) Determinação da relação Albumina/Globulinas.
c) Separação eletroforética das proteínas séricas.

A separação eletroforética das proteínas séricas ou eletroforese de proteínas inclui a determinação da concentração total de proteínas, e mesmo sendo um método "semiquantitativo", fornece dados importantes para o estudo das hepatopatias agudas e crônicas. Quando analisado juntamente com outros testes de função hepática amplia as possibilidades diagnósticas.

Separação eletroforética das proteínas séricas

A eletroforese refere-se à migração de partículas em um meio líquido sob a ação de um campo magnético. A mobilidade das proteínas séricas é diretamente proporcional à carga elétrica de cada partícula, e inversamente proporcional à viscosidade do meio.

Existem dois tipos de metodologia para a eletroforese: a eletroforese convencional, por zona, onde as proteínas migram em um meio de suporte poroso como acetato de celulose, gel de agarose ou poliacrilamida, e a eletroforese capilar, onde a separação das proteínas ocorre por tamanho e propriedades físico-químicas através do fluxo de um tubo capilar.

Para a separação eletroforética das proteínas plasmáticas, em geral, utilizam-se, como suporte, fitas de acetato de celulose ou de agarose. Após a corrida eletroforética (10 min – tampão pH 8,6 - $\mu = 0{,}06$), coram-se as fitas (Ponceau S), efetua-se a transparentização e faz-se a leitura densitométrica para obtenção do gráfico e cálculo da porcentagem de área de cada uma das frações obtidas. Separadamente, faz-se a dosagem das proteínas séricas totais, a partir de cujo valor quantifica-se a área de cada uma das frações.

Na eletroforese convencional por zona obtêm-se cinco frações, a saber: albumina e α-1, α-2, β e gamaglobulinas.

Na eletroforese capilar obtêm-se seis frações, a saber: albumina e α-1, α-2, β 1, β 2 e gamaglobulinas. Eventualmente, pode ser observada a presença de outra fração: a pré-albumina.

A fração albumina é de composição homogênea e sintetizada exclusivamente no fígado.

As frações α, β e gamaglobulinas são de composição heterogênea. Certo número de proteínas que migram nessas frações, tais como haptoglobina, proteína C-reativa, glicoproteínas, lipoproteínas, transferrina, ceruloplasmina, fibrinogênio e outros fatores da coagulação são sintetizados no fígado.

As imunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE (fração γ) são produzidas pelo sistema retículo-endotelial (SER) (células plasmáticas e linfócitos) (Figura 12.2).

A pré-albumina, normalmente, está presente em baixas concentrações no plasma, de modo que nem sempre aparece no perfil eletroforético.

A albumina é a proteína em maior concentração no plasma: 60% da concentração total de proteínas. Atua no transporte de diversas substâncias, como a bilirrubina livre, e é responsável pela manutenção da pressão oncótica.

Os níveis séricos de albumina podem estar diminuídos em consequência de perdas como, por exemplo, na síndrome nefrótica, enteropatias, queimaduras e ascite. Estados de nutrição inadequada e de desnutrição também produzem hipo-albuminemia. Infecções crônicas associadas com aumentos de interleucina-1 e com fatores de necrose tumoral também podem inibir a síntese da albumina. Excluídas essas causas, a queda de albumina reflete um processo crônico de incapacidade parcial de síntese pelo parênquima hepático. É necessário um período de tempo relativamente longo para que a deficiência de síntese nos hepatócitos se manifeste através de hipoalbuminemia, pois a vida média da albumina no plasma é de 22 a 26 dias.

Frequentemente observa-se hipoalbuminemia em pacientes com hepatopatias crônicas, particularmente cirrose.

A bisalbuminemia é uma situação caracterizada pela presença de uma dupla banda na zona da albumina, que pode ser congênita ou adquirida. A forma congênita não tem significância clínica, e a adquirida geralmente está associada ao uso de antibióticos e à presença de ascite ou fístula pancreática.

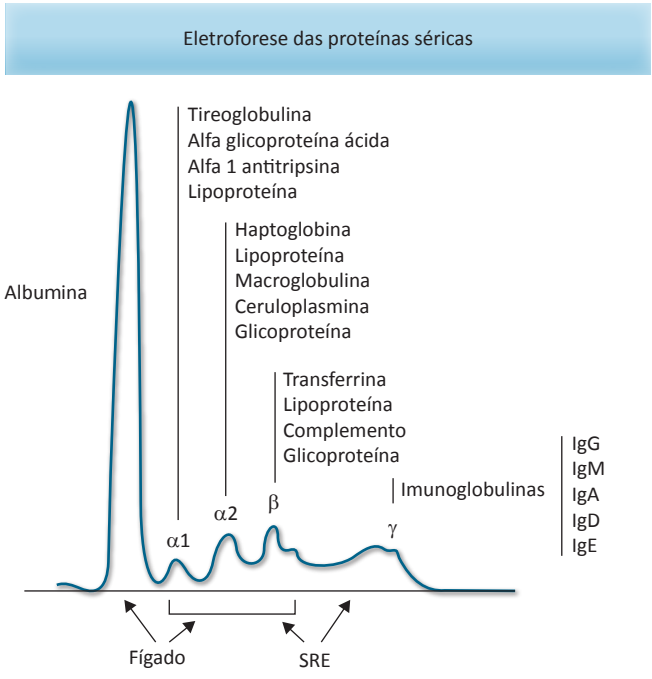


Figura 12.2 Separação eletroforética das proteínas séricas em acetato de celulose.
Fonte: Silva LC da, *et al*. 1983.

As proteínas que migram nas α-1, α-2 e betaglobulinas têm vida média menores do que a albumina, de modo que poderá ocorrer diminuição dessas frações como decorrência de insuficiência hepática grave, não necessariamente devido a processos crônicos.

Aproximadamente 85% da fração α-1-globulina é constituída de α-1 antitripsina. O achado dessa fração muito diminuída ou ausente na eletroforese levanta a suspeita de deficiência de α-1 antitripsina, (homozigótica), que está associada ao enfisema pulmonar e à cirrose hepática e deverá ser confirmada por metodologia específica para essa proteína (técnicas imunoenzimáticas). Os estados heterozigóticos da deficiência de α-1 antitripsina não podem ser detectados através da eletroforese de proteínas.

As glicoproteínas que migram nas frações α-1 e α-2 globulinas, principalmente a α-1-glicoproteína ácida tendem a estar aumentadas, em consequência do aumento das respectivas frações nos processos inflamatórios e neoplásicos. Nos hepatocarcinomas pode ser observado um aumento da α-1 globulina por elevação da alfafetoproteína.

Na síndrome nefrótica observa-se um aumento da fração α-2 globulinas, devido a níveis elevados da α-2 macroglobulina. Nessa situação a fração albumina está diminuída.

Lipoproteínas que migram nas frações α-1, α-2 e betaglobulinas, principalmente nas duas últimas, podem ser responsáveis pelo aumento dessas frações nas colestases de duração superior a uma semana.

A fração betaglobulina geralmente está aumentada nos casos de cirrose hepática.

Na maioria dos processos crônicos observa-se um aumento policlonal das gamaglobulinas (fração γ), diferente do aumento monoclonal encontrado em casos de mielomas. Na cirrose hepática, além da fração γ aumentada, observa-se frequentemente uma fusão entre as frações β e γ, devido ao maior aumento das imunoglobulinas do tipo IgA.

Na forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica, em geral, observa-se um perfil semelhante ao da cirrose hepática, e, com alguma frequência, o aparecimento de um pico no lado de maior mobilidade da fração γ, que desaparece com o tratamento da moléstia.

Pela dosagem das imunoglobulinas, que ocorrem na fração γ através de técnicas específicas, algumas alterações podem ser observadas nas hepatopatias: a) aumento isolado da IgM na cirrose biliar primária; b) aumento acentuado da IgG e IgA e menor da IgM, na cirrose alcoólica; c) aumento da IgM na fase inicial das hepatites agudas por vírus.

A eletroforese capilar possui alto poder de resolução, permitindo a separação da fração β em duas bandas: β-1 e β-2. Na banda β-1 correm a transferrina e a hemopexina, e na banda β-2 o complemento (C3). Além disso, a eletroforese capilar parece ter maior sensibilidade para detectar gamopatias monoclonais. Em geral, é mais sensível para detectar componentes monoclonais em pequenas concentrações, em particular IgA ou cadeias leves.

A eletroforese capilar também facilita a detecção dos casos de bisalbuminemia adquirida, relevante em casos de fístula pancreática, presença de ascite e uso de antibióticos, além de evitar os erros frequentes da eletroforese convencional, que detecta

falsos resultados para fibrinogênio. Outra vantagem do uso da eletroforese capilar é que todo o processo pode ser automatizado, garantindo maior rapidez na liberação dos resultados.

Na Figura 12.3 são mostrados alguns perfis característicos observados nas hepatopatias utilizando eletroforese de zona em acetato de celulose.

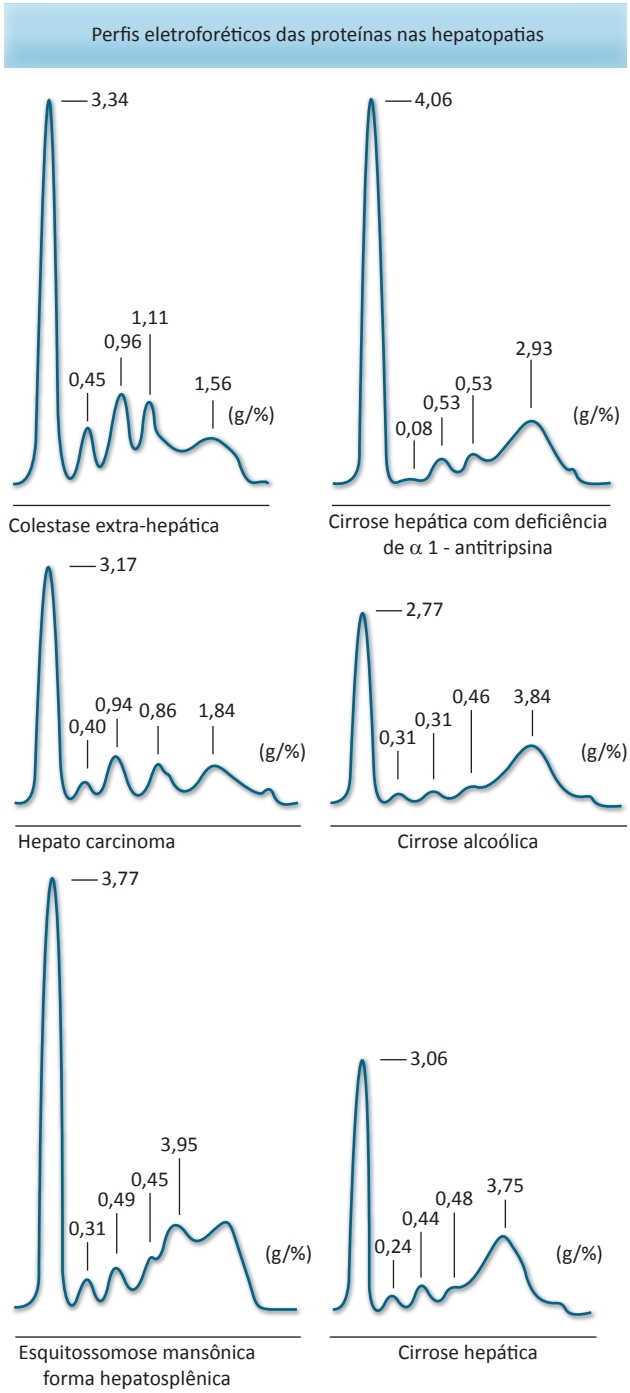


Figura 12.3 Exemplos de perfis eletroforéticos em acetato de celulose, observados nas hepatopatias.
Fonte: Silva LC da, *et al*. 1983.

Na Figura 12.4 mostra-se o perfil eletroforético característico das proteínas séricas, utilizando eletroforese capilar.

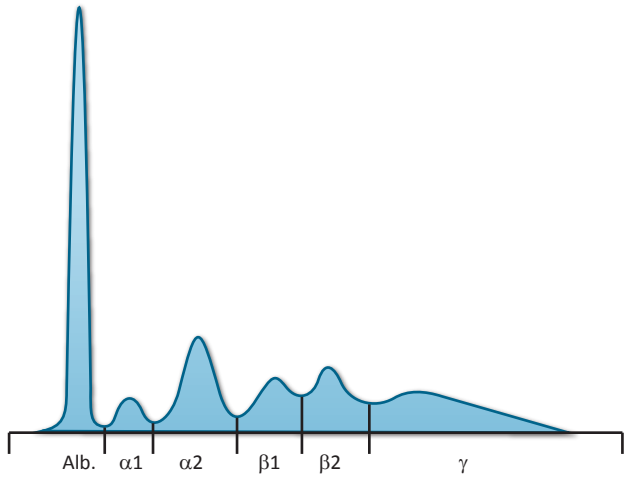


Figura 12.4 Separação das proteínas séricas por eletroforese capilar.
Fonte: Ritchie RF., 1982.

Na Tabela 12.4 constam os valores normais para a separação eletroforética das proteínas séricas.

Tabela 12.4 Eletroforese de proteínas séricas: valores normais.

Frações	%	g/dl
Proteínas totais	100	6,0-7,8
Albumina	50-63	3,2-5,0
α-1	2,5-5,7	0,2-0,4
α-2	5,8-13	0,5-0,9
β	8,5-14,7	0,6-1,1
γ	11,8-20,2	0,7-1,5

Fonte: Adaptada de Sáez-Alquézar, 2006.

Tempo de protrombina (TP)

O tempo de protrombina corresponde ao tempo de coagulação de um plasma citratado, depois que se adiciona tromboplastina (fator III) e cálcio na temperatura de 37 °C.

O TP é o teste usado no controle de pacientes que usam anticoagulantes orais, e é medido em segundos, podendo variar de acordo com o laboratório e com o método utilizado. Em geral, os valores normais estão entre 11 e 14 segundos.

Pelo fato de poderem ser usados diversos tipos de fator tissular nos reagentes para determinação do TP, foi preconizado pela OMS o RNI (Relação normalizada internacional) para padronizar (mundialmente) os resultados obtidos de TP em diferentes laboratórios.

Para o controle de pacientes em uso de anticoagulantes orais utiliza-se apenas o INR. Valores de INR entre 2,0 e 3,0 são considerados eficazes para esse tipo de paciente.

Com exceção do fator VIII, os demais fatores de coagulação são produzidos exclusivamente no fígado. O tempo de protrombina (TP) mede, conjuntamente, os fatores do complexo protrombínico (fatores II, V, VII e X, dependentes da vitamina K), e mais o fibrinogênio.

A meia-vida dos fatores de coagulação varia entre 6 horas (fator VII) a 5 dias (fibrinogênio), ou seja, um *turnover* muito mais rápido que para a albumina, o que significa uma maneira de avaliação da função hepática de forma mais rápida, quando está presente uma diminuição na capacidade de síntese pelo parênquima hepático. O prolongamento do TP pode indicar uma hepatite grave ou cirrose hepática, e também uma obstrução biliar crônica. Como a maioria dos fatores de coagulação é dependente da vitamina K, o prolongamento observado do TP também pode ser devido à deficiência de vitamina K. Nesses casos, a administração de vitamina K (10 mg/dia) corrige o prolongamento do TP num prazo máximo de 48 horas. Excluindo-se a deficiência de vitamina K, o prolongamento do TP superior a 5 segundos, em relação ao controle, é considerado um sinal de mau prognóstico em relação à função do parênquima hepático.

BILIRRUBINAS SÉRICAS

Metabolismo da bilirrubina

Em indivíduos normais, ocorre a formação de 4,4 ± 0,7 mg de bilirrubina/kg de peso corporal em 24 horas, dos quais aproximadamente 70% derivam do grupo prostético Heme da hemoglobina de hemácias maduras, nas células reticuloendoteliais do baço, fígado e medula óssea. Os restantes 30%-40% são formados a partir do catabolismo de outras hemoproteínas, tais como: citocromos, catalases e peroxidases. Com exceção do fígado, a concentração tecidual dessas hemoproteínas é muito baixa, de modo a contribuir muito pouco na formação da bilirrubina.

A contribuição hepática para a produção de bilirrubina total em indivíduos normais é bem significativa (em torno de 23% a 37%), principalmente à custa do citocromo p-450.

Transformação do heme em bilirrubina

Inicialmente, o Heme é convertido em biliverdina IX-α, pela ação da enzima hemeoxigenase de localização microssomal. A enzima hemeoxigenase, comprovadamente diferente do citocromo p-450, está presente no fígado, nos rins e macrófagos, podendo ser estimulada de três a vinte vezes pela administração de heme ou hemoglobina. Isso representa um mecanismo eficiente de defesa para catabolizar os níveis séricos de bilirrubina aumentados, que se observam nos processos hemolíticos e nas hemorragias internas.

A biliverdina IX-α transforma-se em bilirrubina IX-α através de reação catalisada pela enzima biliverdina-redutase, de localização citoplasmática.

A molécula de bilirrubina é constituída de quatro anéis pirrólicos ligados entre si através de três pontes de carbono. Possui oito cadeias laterais (metil, vinil, metil, ácido propiônico, ácido propiônico, metil, metil, vinil). Esta bilirrubina IX-α (isômero geométrico Z, Z) é praticamente insolúvel em água (0,1 μmol/L em pH 7,4) e solúvel em solventes orgânicos não polares, devido a que seus grupos hidrofílicos estão ligados através de pontes de hidrogênio. Aumentando-se o pH do meio, quebram-se as ligações de hidrogênio conseguindo-se, desta forma, maior solubilidade em solventes polares.

Transporte da bilirrubina no plasma

O pigmento recém-formado, *bilirrubina livre*, praticamente insolúvel em água, é lançado na circulação sanguínea, onde é transportado firmemente ligado à albumina.

Também ocorre ligação da bilirrubina, em menor proporção com eritrócitos, principalmente quando os níveis de albumina estão diminuídos. Da mesma forma, a alfafetoproteína presente em grandes quantidades em fetos e em recém-nascidos, parece ter certa afinidade de ligação com a bilirrubina livre.

A molécula da albumina possui um centro primário de alta afinidade para ligação com a bilirrubina além de outros secundários, com menor afinidade. Certas drogas como salicilatos, sulfas, diuréticos e contrastes radiológicos competem com a bilirrubina livre, diretamente no sítio primário de ligação com a albumina.

A administração de heparina produz diminuição na capacidade de ligação da bilirrubina, devido ao fato de a heparina, através da indução da lipase lipoproteica liberar grande quantidade de ácidos graxos que competem na ligação com a albumina.

Em recém-nascidos, observam-se níveis altos de bilirrubina livre, não ligada, no sangue circulante.

Captação hepática da bilirrubina

A captação da bilirrubina pelo hepatócito se dá através de um sistema de transporte, mediado por carreador, onde a bilirrubina se desprende da albumina e liga-se, dentro da célula hepática, a proteínas com afinidade de ligação cerca de cinco vezes maior do que para a albumina.

Conjugação e excreção da bilirrubina

Dentro do hepatócito, no retículo endoplasmático liso, a bilirrubina livre sofre conjugação com o ácido glicurônico, pela ação do sistema enzimático UDP-glicuronil transferase, dando origem à bilirrubina conjugada ou glicuronato de bilirrubina solúvel em água.

A *bilirrubina conjugada* pode ser monoglicuronato (conjugação apenas numa cadeia de ácido propiônico), ou diglicuronato (conjugação nas duas cadeias). Na bile humana predomina o diglicuronato de bilirrubina. O sistema enzimático glicuroniltransferase, de localização microssomal, é constituído de múltiplas formas enzimáticas com atividades

diferentes, frente a diversos substratos. De fato, esse sistema é responsável não só pela conjugação da bilirrubina, mas também pela de outros compostos lipofílicos, tais como os hormônios tireoidianos e as catecolaminas.

Uma vez conjugada, a bilirrubina é rapidamente excretada através das microvilosidades da parede canalicular dos hepatócitos, sendo eliminada na bile sob a forma de um complexo micelar com sais biliares, fosfolípides e colesterol. Chegando ao trato intestinal, é desconjugada pela ação de betaglicuronidases de origem bacteriana (principalmente no íleo terminal e intestino grosso) e reduzida para urobilinogênio. Diariamente, 100 a 200 mg de urobilinogênio são excretados nas fezes e uma pequena quantidade é reabsorvida, sendo reexcretada pelo fígado ou eliminada na urina (circuito êntero-hepático).

Distúrbios no metabolismo da bilirrubina

1. Na formação da bilirrubina
   a) Aumento da bilirrubina Indireta.
   b) Aumento do urobilinogênio urinário e fecal.
   Ex.: Hemólise intravascular e extravascular.
2. No transporte da bilirrubina no sangue
   a) Aumento da bilirrubina indireta
   Ex.: Albumina plasmática diminuída; drogas que competem na ligação com a albumina (sulfas, contrastes radiológicos, diuréticos, salicilatos).
3. Na captação e transporte dentro dos hepatócitos
   a) Aumento da bilirrubina indireta.
   b) Urobilinogênio (urinário e fecal) normal ou diminuído.
   Ex.: Níveis baixos de Ligandina (recém-nascidos, síndrome de Gilbert, ácido flavaspídico, rifampicina, contrastes radiológicos, carneiros mutantes Southdown).
4. Na conjugação da bilirrubina nos hepatócitos
   a) Aumento da bilirrubina indireta.
   Ex.: Icterícia dos recém-nascidos; síndromes de Criegler-Najjar e Lucey-Driscoll; vitamina K, novobiocina, cloranfenicol; ratos Gunn.
   Comprometimento hepatocelular difuso: hepatites por vírus e por agentes tóxicos.
   Doenças hepáticas infiltrativas malignas (carcinomas e linfomas), e benignas (sarcoidose, amiloidose, hemocromatose).
5. Na excreção da bilirrubina conjugada
   a) Aumento da bilirrubina total à custa da bilirrubina conjugada.
   b) Bilirrubina conjugada na urina: reação positiva.
   c) Urobilinogênio (urinário e fecal): diminuído.
   I. Pelos hepatócitos.
   Ex.: Drogas que interferem com a secreção de bilirrubina (esteroides 17-α-alkylados) ou que comprometem o fluxo biliar intra-hepático (estrógenos e fenotiazinas), pericolangite, cirrose biliar primária, síndromes de Dubin-Johnson e de Rotor, carneiros mutantes Corriedale.
   II. Pelo sistema biliar
   Ex.: Obstrução intraductos biliares (litíases, constrições, tumores) ou obstrução extraductos biliares (tumores de pâncreas, edema pancreático e inflamação de linfonodos).

Metodologias para determinação da bilirrubina

Os métodos utilizados para a dosagem de bilirrubinas (livre e conjugada) baseiam-se na reação de Van Der Berg (reação do pigmento com ácido sulfanílico diazotado). A bilirrubina conjugada solúvel em água dá reação direta em solução aquosa de ácido sulfanílico diazotado, ao passo que a bilirrubina livre insolúvel em água necessita da adição de um acelerador (benzoato de cafeína ou metanol), dando assim uma reação indireta.

O método de Jendrassik-Grof e suas modificações utilizam benzoato de cafeína como acelerador, mostrando boa sensibilidade, e fornecem valores reais de bilirrubina indireta. Detecta-se a presença de bilirrubina na urina através do teste de Harrison-Fouchet (ou de tiras plásticas comercializadas para detecção de substâncias químicas na urina).

A pesquisa de urobilinogênio é feita utilizando-se o reativo de Erlich, que produz coloração vermelho-cereja com o pigmento.

Consideram-se valores normais:

1. Níveis séricos de bilirrubinas:
   a) Bilirrubina direta (conjugada): até 0,4 mg/dL.
   b) Bilirrubina indireta (livre): até 0,6 a 0,9 mg/dL.
   c) Bilirrubina total (livre+conjugada): até 1,0 a 1,3 mg/dL.
2. Bilirrubina conjugada na urina: reação negativa.
3. Urobilinogênio na urina: reação positiva até a diluição de 1:40.
4. Urobilinogênio nas fezes: reação positiva.

■ ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS OBSERVADAS NAS HEPATITES POR VÍRUS

Hepatite por Vírus A (HVA)

Em pacientes sintomáticos observam-se aumentos importantes dos NSA das aminotransferases e da FA, e da concentração de bilirrubinas séricas. Em geral, os NSA da ALT são maiores do que os da AST e podem atingir valores elevados de até 100 vezes o LSN. Inicialmente se observa o aumento das aminotransferases e, depois, dos níveis de bilirrubina.

A taxa de bilirrubina pode atingir valores altos de até 10 mg/dL nos casos em que se observa a fase colestática.

Hepatite por Vírus E (HVE)

A HVE pode apresentar desde formas subclínicas até hepatites graves.

Nos casos de HVE observa-se, também, aumento da ALT, AST e da bilirrubina sérica. Em geral, essas alterações

bioquímicas, bem como os sintomas clínicos desaparecem em poucas semanas. Ao contrário da HVA, as alterações podem ser mais severas e são frequentes as alterações da coagulação. Quando a HVE ocorre em gestantes, durante o 3º trimestre da gravidez, tem-se observado formas graves da doença com evolução para formas de hepatite fulminante em até 3% dos casos. Nessa situação, os NSA das aminotransferases aumentam muito, mas podem cair rapidamente para NSA normais, por falta de substrato, devido à necrose submaciça dos hepatócitos. Estudos recentes têm mostrado que as infecções causadas pelo VHE do genótipo 4 levam a aumentos maiores dos NSA das aminotransferases (> 100 LSN).

Hepatite por Vírus B (HVB)

Na fase aguda da HVB os NSA da ALT e AST podem atingir valores muito elevados, entre 30 a 50 × LSN. Os NSA da ALT, em geral, são mais altos que os da AST. A concentração de bilirrubinas pode ser normal na maioria dos pacientes, a não ser naqueles em que se observa uma fase colestática. Nos casos de evolução normal da doença, os NSA das aminotransferases se normalizam até o quarto mês da infecção. A persistência de NSA alterados das aminotransferases por um período superior a seis meses indica evolução para hepatite crônica. Pacientes na fase crônica da infecção mostram alterações discretas das aminotransferases, mas em períodos de exacerbação da doença poderemos observar NSA extremamente elevados.

Hepatite por Vírus C (HVC)

A maioria dos pacientes que se infecta pelo VHC é assintomática e a icterícia está presente em menos de 25% dos casos. A maioria dos casos de infecção aguda não é documentada. Apenas em situações especiais, em que há um seguimento, por pertencerem a grupos de alto risco.

Em pacientes sintomáticos se observa um aumento dos NSA das aminotransferases semelhante ao das outras hepatites, que retornam aos níveis normais num período de até 12 semanas. O desaparecimento do RNA-HVC indica que ocorreu a cura da infecção, mas isso ocorre em menos de 20% dos indivíduos infectados, apesar de terem se normalizado os NSA das aminotransferases. Indivíduos assintomáticos e compensados com a forma crônica da HVC poderão apresentar NSA discretos de até 2 × LSN. A evolução para formas de fibrose mais avançada e até cirrose poderão mostrar aumentos discretos da ALT e da AST, com predominância da AST.

■ PROVAS DE FUNÇÃO HEPÁTICA

Os testes laboratoriais empregados no estudo das hepatopatias refletem apenas determinados aspectos de comportamento do órgão, mas não refletem a função hepática como um todo.

A função hepática pode ser definida como um conjunto integrado de processos, que tem lugar no fígado e inclui a integridade do parênquima hepático (massa hepática funcionante), a manutenção de um suprimento adequado de sangue (fluxo hepático) e a capacidade de drenagem adequada por parte dos ductos biliares e das veias hepáticas.

Devido à complexidade desses processos, torna-se muito difícil encontrar uma única prova que consiga medir a função hepática de modo global.

No desenvolvimento das provas de função hepática foram utilizados dois tipos de abordagem. Um deles é o monitoramento da função de clareamento hepático (*clearance*). A remoção hepática de substâncias, somente por processos físicos, é de menor importância, e o conceito de *clearance* passou a ser analisado do ponto de vista de processo enzimático.

A medida de "*clearance*" foi introduzida por Lewis em 1948, como substituto dos testes qualitativos de retenção ou excreção, atribuindo desta forma um aspecto quantitativo aos testes de função hepática. "*Clearance*" pode ser definido como a medida do volume, contendo uma substância, que é clareado para essa substância por unidade de tempo.

As provas de clareamento dependem da perfusão do fígado, da transferência da substância utilizada, do sangue para os hepatócitos, bem como da quantidade e composição enzimática da massa hepática funcionante. Cada um desses fatores pode estar alterado nas hepatopatias. A medida do *clearance*, com verde de indocianina ou com galactose reflete principalmente alterações na perfusão hepática (fluxo hepático).

Outro tipo de abordagem para o desenvolvimento de provas de função hepática leva em consideração os mecanismos enzimáticos que ocorrem no parênquima hepático. A remoção hepática de substâncias específicas por processos enzimáticos constitui-se na base das principais provas de função hepática utilizadas na atualidade.

Realmente, verificou-se que o "*clearance*" como medida quantitativa da função hepática tinha valor limitado e deveria dar-se preferência à determinação das velocidades máximas de remoção.

Assumindo que existe um fator limitante para cada reação dentro dos hepatócitos, determinado pela quantidade de enzima presente na etapa limitante de velocidade da mesma, podemos medir quantitativamente a função hepática através das velocidades máximas de determinados processos metabólicos que são proporcionais à massa hepática funcionante.

As provas quantitativas para avaliar a função hepática são importantes para:

a) Definir a função hepática residual.
b) Seguimento do curso da doença e prognóstico em pacientes com hepatopatias agudas e cirrose.
c) Prever o risco cirúrgico e o curso do pós-operatório em pacientes com função hepática residual reduzida.
d) Determinar o tempo certo para o transplante de fígado.

Clearance do verde de indocianina

O verde de indocianina (VI) é um corante que apresenta pico máximo de absorção entre os comprimentos de onda de 800 a 815 nm. Foi proposto inicialmente por Fox e col., em 1975, para estudos de diluição em cardiopatias.

Quando introduzido na circulação sanguínea, liga-se às proteínas plasmáticas, principalmente às alfalipoproteínas e à albumina. A remoção do sangue é feita exclusivamente pelas células do parênquima hepático, não sofrendo nenhuma transformação química em sua passagem pelo fígado, sendo excretada na bile sob a forma livre.

O VI não sofre circulação êntero-hepática, e nas doses comumente empregadas não produz efeitos tóxicos, sendo toleradas até doses de 50 mg/kg de peso corporal. Devido à ausência de processos de remoção extra-hepáticos, o VI continua sendo utilizado para estudos de fluxo hepático. Diversos estudos mostram que o VI também pode ser utilizado para estudos de função hepática.

Teste da aminopirina

A aminopirina é oxidada no fígado em duas etapas pelo sistema citocromo P-450, até aminoantipirina. Essa oxidação corresponde a uma dupla desmetilação, que confere à molécula original características hidrofílicas necessárias à sua excreção.

O sistema citocromo P-450 é considerado dependente de amino- oxigenases, presente em altas concentrações no fígado e responsável pelo metabolismo hepático de diversas substâncias que envolvem reações de óxido-redução. Inicialmente o clareamento plasmático da aminopirina foi utilizado na avaliação quantitativa da função hepática. Devido à demora do teste e a dificuldades técnicas para a determinação da antipirina plasmática, passou a ser pouco utilizado na prática.

Em 1973, utilizando-se aminopirina isotopicamente marcada, nos dois grupos metila, que são liberados quando ocorre a oxidação da droga no fígado, verificou-se experimentalmente que a quantidade de $^{14}CO_2$ exalado na respiração era proporcional à queda de radioatividade plasmática. Desta forma, foi evidenciado que a medida de $^{14}CO_2$ no ar exalado refletia o metabolismo hepático da aminopirina.

A partir de 1974, utilizando-se a mesma metodologia no homem, concluiu-se que, após duas horas da administração oral de aminopirina marcada a medida do $^{14}CO_2$ exalado podia ser correlacionada com a velocidade de desaparecimento plasmático da aminopirina, tanto em indivíduos normais como em pacientes com hepatopatias.

O teste da aminopirina marcada, com coleta do ar exalado (*Breath test*) tem mostrado resultados satisfatórios e reflete, principalmente, a massa microssomal residual funcionante, e o tecido hepático disponível. A administração antes da prova de indutores microssomais tais como etanol, fenobarbital e difenil-hidantoína aumenta o perfil respiratório do CO_2, ao passo que outras drogas como cimetidina e anticoncepcionais o deprimem. Em pacientes com hepatopatias de etiologia alcoólica o teste apresenta maior correlação com o grau de comprometimento histológico.

Capacidade hepática de eliminação da galactose (CEG)

A galactose é metabolizada principalmente no fígado, o que justifica seu uso para a avaliação da função hepática sob o aspecto hepatocelular. A transformação da galactose em glicose-1-P, no fígado, ocorre em três etapas. Na primeira etapa ocorre a transformação da galactose em galactose-1-P, pela ação da enzima galactoquinase, e é considerada a etapa limitante de velocidade para a metabolização da galactose. A segunda etapa corresponde à transformação da galactose-1--P em UDP-Galactose. Cabe comentar que essa etapa representa uma solução de continuidade na galactosemia em crianças, por ausência de ambas as enzimas, galactose-1-P--uridiltransferase (que é a única presente em recém-nascidos e crianças), e a UDP-galactose pirofosforilase (presente em adultos). A terceira etapa corresponde à transformação da UDP-galactose em UDP-glicose e assume vital importância por ser dependente de NAD e inibida por $NADH_2$. Em outras palavras, essa etapa é sensível ao estado de óxido-redução intracelular e, portanto, pode ser inibida pela ação de certas drogas como, por exemplo, o etanol.

A realização do teste da CEG é feita por injeção intravenosa de uma solução isotônica de galactose (0,5 mg/kg de peso corpóreo. Em indivíduos normais a CEG é: 270 $\pm$ 40 mg/min). A dose de galactose utilizada na medida da CEG representa um excesso em relação à primeira etapa da metabolização hepática, mediada pela galactoquinase, que é a etapa limitante do processo. Desta forma, podemos considerar que a transformação ocorra em velocidade máxima (ou bem próxima: 96%), permitindo medir quantitativamente a massa hepática funcionante.

A CEG discrimina com bastante sensibilidade entre pacientes com cirrose hepática e indivíduos normais, e consegue avaliar uma fase irreversível no comprometimento hepatocelular.

Teste MEGX

O teste é baseado na injeção intravenosa de lidocaína, na dose de 1 mg/ kg de peso corporal, com coleta de amostras de sangue aos 15, 30 e 60 minutos após a injeção de lidocaína. A lidocaína é metabolizada no parênquima hepático pela ação do citocromo P-450 3A4 que catalisa a oxidação da lidocaína para seu metabólito: monoetilglicina-xilidina (MEGX).

A concentração de MEGX após injeção intravenosa de lidocaína tem sido proposta como um marcador da função hepática microssomal (MEGX *test*). O teste MEGX depende do fluxo sanguíneo hepático (sendo suscetível à hipóxia) e da atividade do citocromo p-450. É um teste quantitativo da função hepática, que mostra boa correlação com a gravidade da doença hepática.

Índices para prever a sobrevida são essenciais para estabelecer o prognóstico e determinar a prioridade para o transplante hepático em pacientes com cirrose hepática.

O teste MEGX tem mostrado boa correlação com os índices (MELD, Child-Pugh) utilizados para prognóstico de sobrevida em pacientes cirróticos. Por esse motivo, o teste MEGX pode ter utilidade na seleção desses pacientes para transplante hepático, bem como para monitorar a função hepática do doador.

Classificação e estadiamento das hepatopatias

Em gera, os níveis séricos de atividade das aminotransferases (ALT e AST) são usados para acompanhar a atividade da doença hepática, mas dependendo da fase de evolução não conseguem avaliar o real comprometimento hepático.

Alguns sistemas têm sido utilizados para avaliar a gravidade da doença hepática crônica. Um deles é a classificação de Child-Pugh para avaliar o prognóstico da doença hepática crônica, principalmente da cirrose. Atualmente, é utilizada para determinar o prognóstico bem como a necessidade de transplante. O escore de Child-Pugh é calculado somando-se os pontos de cinco fatores (Tabela 12.5) e varia de 5 a 15. As classes de *Child-Pugh* vão de A até C (Tabela 12.6), sendo que, em geral, a descompensação indica cirrose com um escore > 7 (classe B), e esse nível é um critério aceito para inclusão no cadastro do transplante hepático.

Outro sistema é a escala MELD ou Modelo para Doença Hepática Terminal, que adota um sistema de pontuação para avaliar a gravidade da doença hepática crônica e também é utilizado para indicar o transplante. O cálculo do MELD é feito com a seguinte fórmula:

$$\text{MELD} = 3{,}78\,[\text{Ln bilirrubina sérica (MG/dL)}] + 11{,}2\,[\text{Ln INR}] + 9{,}57\,[\text{Ln creatinina sérica (MG/dL)}]$$

Na Tabela 12.7 consta a interpretação da escala MELD em pacientes hospitalizados.

Tabela 12.7 Interpretação da escala MELD em pacientes hospitalizados. Mortalidade em três meses.

Pontuação	Mortalidade
≥ 40	100%
30-39	83%
20-29	76%
10-19	27%
<10	4%

Fonte: Botta *et al.*, 2003.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo foram apresentados os testes bioquímicos mais utilizados para avaliar as hepatopatias, incluindo algumas provas de função hepática e alguns modelos para avaliar estados avançados de comprometimento hepático. A ideia foi a de transmitir, basicamente, dois conceitos que consideramos importantes na área de diagnóstico laboratorial:

1. A importância de conhecimento dos aspectos fisiopatológicos envolvidos na aplicação de testes laboratoriais no estudo das hepatopatias, para poder analisar adequadamente os resultados obtidos.

Tabela 12.5 Classificação de *Child-Pugh*. Cálculos utilizados.

Cirrose – fator de classificação	1 ponto	2 pontos	3 pontos
Bilirrubina sérica μmol/L (mg/dL)	< 34 (< 2,0)	34-51 (2,0-3,0)	> 51 (> 3,0)
Albumina sérica, g/L (g/dL)	> 35 (> 3,5)	30-35 (3,0-3,5)	< 30 (< 3,0)
Ascite	Nenhuma	Facilmente controlada	Mal controlada
Distúrbio neurológico	Nenhum	Mínimo	Coma avançado
Tempo de protrombina (segundos de prolongamento) INR	0-4 < 1,7	4-6 1,7-2,3	> 6 > 2,3

Fonte: Adaptada de Child *et al.*, 1973.

Tabela 12.6 Classificação da doença hepática crônica em classes de A a C de acordo com o escore de *Child-Pugh*.

Pontos	Classe	Sobrevida em um ano	Sobrevida em dois anos
5-6	A	100%	85%
7-9	B	81%	57%
10-15	C	45%	35%

Fonte: Adaptada de Child *et al.*, 1973.

2. A importância da associação de testes bioquímicos que, em conjunto com os dados clínicos, possam permitir um diagnóstico coerente, baseado em evidências.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. AGA Technical Review on the Evaluation of Liver Chemistry Tests. Gastroenterology. 2002;123:1367-84.
2. Aronsen KF, Hanson A, Nosslin B. The value of gama glutamyl transpeptidase in differentiating viral hepatitis from obstructive jaundice. A statistical comparison with alkaline phosphatase. Acta Chir Scand. 1965;130:92.
3. Baker AL, Kotake AN, Schoeller DA. Clinical utility of breath tests of the assessment of hepatic function. Semin Liver Dis. 1983;3(4):318.
4. Bartels H, Hauck W, Vogel I. Aminopyrine – an effective modifier of liver and serum gama-glutamyl transpeptidase. J Pediatrics. 1975;86:298.
5. Berk PD, Blaschke TF, Scharschmidt BF, et al. A new approach to quantitation of the various sources of bilirrubin in man. J Lab Clin Med. 1976;87:767.
6. Botta F, Giannini E, Romagnoli P, et al. MELD scoring system is useful for predicting prognosis in patients with liver cirrhosis and is correlated with residual liver function: a European study. Gut. 2003;52:134-9.
7. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, et al. Harrison`s Principles of Internal Medicine. 15.ed. New York: Ed. McGraw-Hill, 2001.
8. Caesar J, Shaldon S, Chiandussi L, et al. The use of indocyanine green in the measurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function. Clin Sci. 1961;21:43.
9. Cameron V. Sensitivity and specificity of tests of liver injury. Clin Med Res. 2004 Nov;2(4):205.
10. Cherrick GR, Stein SW, Leevy CM, et al. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay and hepatic extraccion. J Clin Invest. 1960;39:592.
11. Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. In: The liver and portal hypertension. Edited by CG Child. Philadelphia: Saunders, 1964. p.50-64.
12. Claeys R, Groven C, Gorus FK. Capillary zone electrophoresis of proteins in body fluids: comparison of capillary and agarose gel electrophoresis. Clin Chem. 2001;5:967-70.
13. Coates P. Liver function tests. Aust Fam Physician. 2011 Mar;40(3):113-5
14. Fauvert RE. The concept of hepatic clearance. Gastroenterology. 1959;37:603.
15. Fishman WH, Bardawill WA, Habib HG, et al. The placental isoenzymes of alkaline phosphatase in sera of normal pregnancy. Am J Clin Pathol. 1972;57:65-74.
16. Giannini E, Risso D, Botta F, et al. Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine amino transferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus – related chronic liver disease. Arch Intern Med. 2003;163:218-24.
17. Gonzalez AS, Davis GL. Dermographics of hepatitis C vírus today. Clin Liver Dis. 2012;1(1):1-5
18. Guder WG, Nabicht A, Kleissl J, et al. The diagnostic significance of liver cell inhomogeinity: Serum enzymes in patients with central liver necrosis and distribution of glutamate dehydrogenase in normal human liver. J Clin Chem Biochem. 1975;13:311.
19. Hepatology. A clinical text book. 2009. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: <www.HepatologyTextbook.com>
20. Hepner GW, Vessell ES. Quantitative assessment of hepatic function by breath analysis after oral administration of [14C]-aminopyrine. Ann Intern Med. 1975;83:632.
21. Irving CS, Schoeller DA, Nakamara KN, et al. The aminopyrine breath test as a measure of liver function. J Lab Clin Med. 1982;100:356.
22. Jendrassik L, Grof P. Vereinfachte photometrische methoden zur bestimmung des blutbilirrubins. Biochem Z. 1938;297:81.
23. Keren DF. Capillary zone electrophoresis in the evaluation of serum protein abnormalities. Am J Clin Pathol. 1998;110:248-52
24. Laker MF. Liver function tests. BMJ. 1990 Aug 4;301(6746):250-1.
25. Lehmann H, Ryan E. The familiar incidence of low pseudocholinesterase level. Lancet. 1956;ii:124.
26. Leiberman J. Emphysema cirrhosis and hepatoma with alpha-1-antitrypsin deficiency. Ann Intern Med. 1971;81:83.
27. Lieberman D, Phillips D. "Isolated" elevation of alkaline phosphatase: significance in hospitalized patients. J Clin Gastroenterol. 1990;12:415-9.
28. Musana KA, Yale SH, Abdulkarim AS. Tests of liver injury. Clin Med Res. 2004 May;2(2):129-31
29. Oellerich M, Ringe B, Gubernatis G. Lidocaine metabolite formation as a measure of pre-transplant liver function. Lancet. 1989;25:640-42.
30. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, et al. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. Br J Surg. 1973;60(8):646-9.
31. Ritchie RF. Proteínas específicas. In: Henry JB. Diagnósticos Clíncios. Conduta Terapêutica por exames laboratoriais. 16ed.1982; 255-259.
32. Sáez-Alquézar A, Bassit L, Sabino EC. Hepatites. In: Diagnóstico Laboratorial. Avaliação das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto – imunes: Correlação Clínico–Laboratorial. Dr. Antonio Walter Ferreira e Drª Sandra do Lago Moraes de Avila. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
33. Sáez-Alquézar A, Chamone DAF, Ohtsuki N, et al. Determinação da atividade enzimática da guanase e da gama-glutamil-transpeptidase em hepatopatias agudas e crônicas. Comparação com outros parâmetros bioquímicos de avaliação funcional hepática. Arq Gastroent S Paulo. 1976;13:159.
34. Sáez-Alquezar A. Avaliação Laboratorial da Função Hepática. In: Adávio de Oliveira e Silva e Luiz Carneiro D'Albuquerque – Hepatologia Clínica e Cirúrgica. São Paulo: Sarvier, 1986. p.71-93.
35. Sáez-Alquézar A. Testes Bioquímicos para o estudo da Função Hepática. In: Tratado de Clínica Médica. São Paulo: Editora Roca, 2006. p.1191-2000.
36. Shaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. World J Gastroenterol. 2007;13(1):14-21.
37. Shifman ML, Luketic VA, Sanyal AJ, et al. Hepatic lidocaine metabolism and liver histology in patients with chronic hepatitis and cirrhosis. Hepatology. 1994;19:933-40.
38. Silva LC da, Sáez-Alquézar A, Camargo EP, et al. Determinação da gama glutamiltransferase (GGT) no diagnóstico diferencial das icterícias. Valor do índice ALT/GGT. Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo. 1978;33:234.

39. Silva LC da, Sáez-Alquezar A, Carrilho FJ, et al. Proteínas séricas. Eletroforese e importância clínica. Rev Bras de Med. 1983; 40:386-92.
40. Solter PF. Clinical pathology approaches to hepatic injury. Toxicol Pathol. 2005;33(1):9-16.
41. Testa R, Caglieris S, Risso D, et al. Monoethyllycinexylidide formation measurement as a hepatic function test to asses severity of chronic liver disease. Am J Gastroenterol. 1997; 92:2268-7.
42. Tygstrup N. Determination of hepatic elimination capacity (Lm) of galactose by simple injection. Scand J Clin Lab Invest. 1966;18:92.
43. Vandenberg HAA, Nuller P. Über eine direkte und indirekte diazoreaktion auf bilirrubin. Biochem Z. 1916;77:93.
44. Villeneuve JP, Infante-Rivard C, Ampelas M, et al. Prognostic value of the aminopyrine breath test in cirrhotic patients. Hepatology. 1986;6:928-31.
45. Westwood A. The analysis of bilirrubin in serum. Ann Clin Biochem. 1991;28:119-30.
46. Whitfield JB, Pounder RE, Neale G, et al. Serum gamma-glutamyl transpeptidase activity in liver disease. Gut. 1972;13:702-8.
47. Zipprich A, Steudel N, Behrmann C, et al. Functional significance of hepatic arterial flow reserve in patients with cirrhosis. Hepatology. 2003;37(2):385-92.

PARTE

4

Líquidos Biológicos

Mauren Isfer Anghebem

13

capítulo

Mauren Isfer Anghebem ▪ Júlio Cezar Merlin

Líquido Amniótico

INTRODUÇÃO

O líquido amniótico é o fluido biológico que envolve o feto durante a gestação. Contido no interior da bolsa amniótica, ele protege o embrião de choques mecânicos e mantém a temperatura estável, além de fornecer nutrientes para seu desenvolvimento.

Por conter células e metabólitos do feto, a análise do líquido amniótico pode ser utilizada para diagnóstico de sofrimento e maturidade fetal, de anomalias cromossômicas, defeitos do tubo neural e distúrbios genéticos. Neste capítulo serão destacados alguns dos testes mais utilizados para a detecção dessas condições.

FISIOLOGIA DO LÍQUIDO AMNIÓTICO

Formação

A bolsa amniótica é constituída por uma membrana derivada da somatopleura – combinação do ectoderma com o mesoderma –, também denominada âmnio. A formação da bolsa amniótica ou âmnio tem início uma ou duas semanas após a concepção, juntamente com a produção do líquido amniótico, que aumenta de volume com a progressão da gestação, com a contribuição do organismo materno e fetal. O líquido amniótico é formado pela placenta, que fornece água e solutos, e outra quantidade de líquido provém da urina e do trato respiratório do feto, do cordão umbilical, além do âmnion.

Função

A função do líquido amniótico não se restringe à proteção mecânica do feto. Outras importantes funções desse fluido são: manter a temperatura ideal para o feto, permitir a circulação adequada para a troca de água e compostos orgânicos e inorgânicos com a mãe, além de conter proteínas e peptídios fundamentais para o processo de desenvolvimento do embrião.

Composição

A composição do líquido amniótico é semelhante à do plasma materno, sendo composto por 98% a 99% de água, e o restante por células fetais de diversos tecidos e substâncias bioquímicas produzidas pelo feto. Durante a evolução da gestação, o líquido é absorvido e renovado continuamente, e sua composição se modifica. Um exemplo é o fato de que quando o feto começa a urinar, as concentrações de creatinina, ácido úrico e ureia aumentam e, em contrapartida, as concentrações de proteínas e glicose diminuem.

Pelo fato de haver a deglutição e inalação do líquido amniótico pelo feto, além da liberação da urina nesse meio, a presença de células fetais epiteliais das vias urinária e digestiva pode ser utilizada para algumas análises laboratoriais, inclusive para estudos citogenéticos. Além dessas células, o líquido amniótico contém substâncias bioquímicas, que podem ser dosadas para avaliar o estado de saúde fetal ou sua maturidade. Dentre as substâncias bioquímicas encontradas no líquido amniótico estão: proteínas, eletrólitos, bilirrubina, enzimas, hormônios, lipídios e compostos nitrogenados não proteicos. O líquido amniótico também contém fatores proinflamatórios (interleucina 6, IL-6, IL-8, IL-1β) e anti-inflamatórios (IL-10), além de diversos fatores de crescimento, que estão associados ao desenvolvimento fetal.

Assim como no plasma, a albumina representa cerca de 50% a 70% das proteínas totais do líquido amniótico. No entanto, sua composição proteica difere aproximadamente 65% da composição proteica do plasma.

Mais de oitocentas proteínas já foram identificadas no líquido amniótico, entre elas a alfafetoproteína, a qual é produzida pelo saco vitelínico no início da gestação, e, posteriormente, pelo fígado e liberada para o líquido amniótico através da urina fetal. Apesar da função ainda pouco conhecida, a dosagem da alfafetoproteína é utilizada na identificação de diversas patologias que envolvem o feto.

Volume

A produção de urina e fluido pulmonar fetal e a reabsorção pela deglutição fetal e pelos fluidos intramembranosos são os responsáveis pela manutenção do volume de líquido amniótico. A quantidade de líquido aumenta durante a gestação, atingindo 1.000 a 2.000 mL durante o terceiro trimestre.

No primeiro trimestre, uma pequena quantidade de líquido é proveniente da mãe, porém, na metade da gestação o feto inicia a secreção de uma quantidade de agentes surfactantes para expansão dos pulmões, acarretando aumento do volume do líquido amniótico. E, com o início da produção de urina fetal, o feto começa a deglutir o líquido amniótico, regulando seu volume.

Um acúmulo de líquido amniótico acarretando volumes superiores a 2.000 mL é denominado *poli-hidrâmnio* ou *hidrâmnio*. Essa condição é diagnosticada em 1% das gestações e, embora cerca de 2/3 dos casos sejam idiopáticos, o restante é associado a complicações tais como: distúrbios do tubo neural, anomalias cromossômicas, anomalias gastrointestinais ou do sistema nervoso central do feto, infecções congênitas, arritmias cardíacas, diabetes materno ou gestação múltipla. Essas associações são plausíveis, uma vez que anomalias tais como: fenda labial (lábio leporino), fenda palatina, atresia de esôfago ou de duodeno promovem uma redução na deglutição fetal ou falha na absorção do líquido no trato gastrointestinal do feto, e, consequentemente, aumento de volume do líquido amniótico. O diabetes materno pode ocasionar aumento da produção de urina fetal, ocasionando também poli-hidrâmnio. A síndrome de Bartter pré-natal, nefropatia tubular rara, deve ser investigada quando houver poli-hidrâmnio sem anomalias fetais ou de placenta aparentes. Neste caso, a dosagem aumentada de cloretos no líquido amniótico é esperada.

Quantidades reduzidas de líquido amniótico ou *oligo-hidrâmnio* (volume inferior a 500 mL) podem ser decorrentes de deformidades no trato urinário, maior deglutição fetal, falhas nas membranas, redução do fluxo sanguíneo na placenta ou por ruptura prematura do âmnion. A deficiência do líquido amniótico pode causar hipoplasia pulmonar e malformações, como consequência da compressão do feto pelo útero.

AMNIOCENTESE

Uma amostra do líquido amniótico pode ser obtida através de um procedimento ambulatorial conhecido como amniocentese. Essa técnica consiste na retirada de uma pequena quantidade de líquido amniótico por punção aspirativa da bolsa amniótica. A técnica mais utilizada é a amniocentese transabdominal guiada por ultrassonografia, mas outras técnicas e procedimentos podem ser utilizados, dependendo da preferência do clínico.

Indicação

A amniocentese é considerada um procedimento simples, rápido e seguro, especialmente quando realizada após a 14ª semana de gestação. Há um pequeno risco de lesão do feto com a agulha, que pode causar infecções e, mais raramente, risco de aborto espontâneo. Por esses motivos, a amniocentese não é um procedimento de rotina em todas as gestações.

Sua realização é recomendada para detectar e diagnosticar determinados defeitos congênitos, doenças genéticas e anomalias cromossômicas em fetos, principalmente se os testes de triagem gestacional forem anormais. Indicado também para avaliar a maturidade pulmonar fetal e para diagnosticar e monitorar a doença hemolítica em fetos, causada por incompatibilidade de grupos sanguíneos entre mãe e feto.

Para avaliar a presença de doenças genéticas, anomalias cromossômicas e defeitos do tubo neural, a amniocentese é indicada entre a 15ª e a 20ª semana de gestação. Quando houver risco aumentado ou necessidade de parto prematuro, a técnica pode ser realizada para avaliar a maturidade pulmonar fetal, após a 32ª semana de gestação. Depois desse período de gestação, testes bioquímicos também podem ser realizados para monitorar os níveis de bilirrubina, quando há suspeita de que a gestante desenvolveu anticorpos contra os antígenos das hemácias fetais. Nesse caso, são feitas medidas repetidas da bilirrubina, em geral a cada 14 dias.

Se houver suspeita de infecção congênita (infecção transmitida da mãe para o feto durante a gestação), o líquido amniótico pode ser analisado para investigar a presença do microrganismo responsável pela infecção. Os mais comuns são: *Citomegalovirus*, *Toxoplasma gondii*, *Candida* spp, *Ureaplasma* spp, *Mycoplasma* spp, *Fusobacterium* spp, *Streptococcus* spp, *Bacteroides* spp e *Prevotella* spp.

Coleta e processamento da amostra

Para realizar a amniocentese, todo o abdômen da mãe é limpo com gaze estéril embebida em solução antisséptica (clorexidina ou iodopovidina). O clínico utiliza um ultrassom para verificar a posição da placenta e do feto dentro do útero antes de iniciar o procedimento. Um anestésico local pode ser aplicado ou injetado na pele para minimizar o desconforto materno. Uma agulha fina é inserida através da parede abdominal, do útero e da bolsa amniótica para aspirar o líquido amniótico (Figura 13.1).

A quantidade coletada pode variar de 10 a 20 mL (máximo 30 mL), em várias seringas, para evitar a contaminação de toda a amostra com sangue materno e células. Desta forma, é aconselhável descartar os primeiros 2 ou 3 mL coletados. Imediatamente após a coleta, o líquido deve ser aliquotado em tubos plásticos estéreis, e um deles deve ser protegido da luz, para a determinação de bilirrubinas. Tubos de vidro não são recomendados, por promover a adesão das células à sua superfície.

O processamento da amostra de líquido amniótico varia conforme o exame solicitado. Em todos os casos, se for necessário armazenar a amostra por mais de 24 horas, ela deve ser congelada, mas repetidos ciclos de congelamento e descongelamento devem ser evitados. As alíquotas devem ser homogeneizadas vigorosamente após o descongelamento.

Para a realização de testes bioquímicos, a amostra deve ser centrifugada (2.000 a 2.500 rpm/10 minutos) para separar completamente as células fetais do líquido sobrenadante, evitando possíveis interferências do metabolismo celular. Para testes de maturidade pulmonar fetal, a amostra deve permanecer congelada e o teste deve ser realizado em até 72 horas. As alíquotas destinadas aos estudos citogenéticos (análises cromossômicas e do DNA) devem permanecer em temperatura ambiente ou incubadas a 37 °C, a fim de manter as cé-

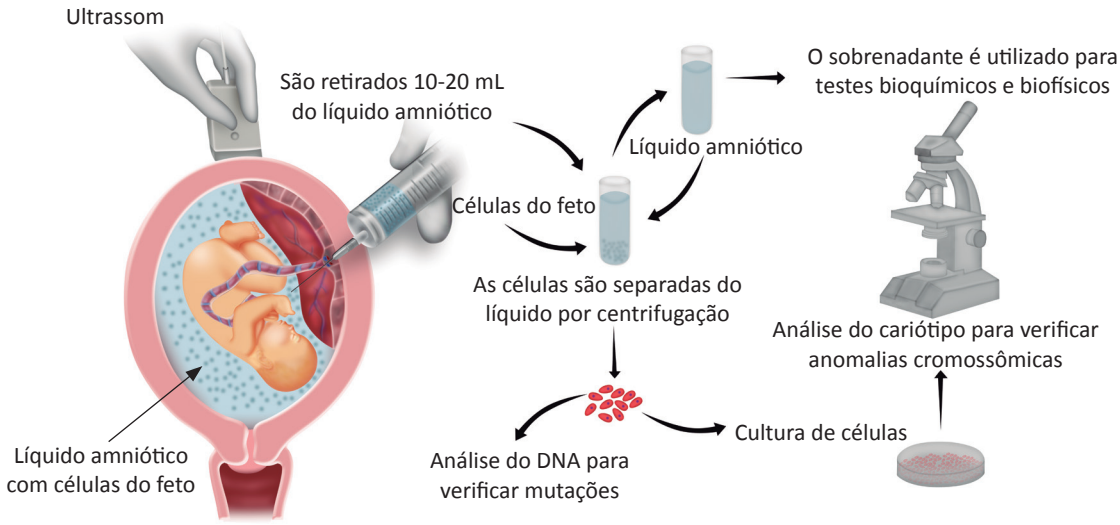


Figura 13.1 Ilustração esquemática da amniocentese. Com o auxílio de ultrassom, o médico determina o melhor local para puncionar a agulha. Uma pequena quantidade do líquido amniótico é aspirada e distribuída em tubos plásticos. As células do feto e a parte líquida são separadas por centrifugação, e a amostra será processada conforme o teste que será realizado.
Fonte: Cintia Marques Vieira.

lulas vivas e bem conservadas, e centrifugadas a 1.000 rpm/5 minutos antes das análises específicas.

ANÁLISE LABORATORIAL DO LÍQUIDO AMNIÓTICO

Diversos exames podem ser realizados com o líquido amniótico para avaliar o estado de saúde do feto. Com base na finalidade dos exames, eles podem ser divididos em: 1) testes para diagnóstico pré-natal de anomalias cromossômicas, distúrbios genéticos e defeitos congênitos; 2) testes de sofrimento fetal; e 3) testes de maturidade fetal.

Exame físico

O líquido amniótico normal é incolor ou branco-amarelado e apresenta um aspecto ligeiramente turvo em virtude da sua celularidade. O aspecto do líquido vai modificando no decorrer da gestação, sendo claro e sem grumos no início da gestação (menos de 12 semanas de gestação), passando a opaco e com grumos a partir da 36ª semana de gestação.

Alterações na cor do líquido amniótico podem indicar problemas com o feto. Uma cor amarelo-escuro está associada à presença de bilirrubina, indicativa de lise eritrocitária, e, consequentemente, de doença hemolítica do recém-nato por incompatibilidade de grupos sanguíneos ABO e Rh. Uma coloração verde-escuro pode ser resultante da primeira evacuação do feto, denominada mecônio. A aspiração de grandes quantidades de mecônio pelo feto, durante a deglutição do líquido amniótico, pode ser preocupante.

O sangue confere uma coloração rosada ou vermelha ao líquido amniótico, e sua presença pode ser resultado de uma punção traumática, de um trauma abdominal ou de hemorragia fetal. A origem do sangue pode ser determinada com a realização do teste de Kleihauer-Betke, que identifica hemoglobina fetal. Líquido amniótico de cor castanho-escuro pode indicar morte fetal.

Exames citológicos microscópicos

A pesquisa de células orangiófilas pelo emprego do corante azul de nilo (também denominada índice citolipídico) pode auxiliar na identificação do grau de maturidade fetal. Essa técnica consiste na mistura de uma gota do líquido amniótico com uma gota de sulfato azul de nilo a 0,1%, homogeneização e leitura em microscópio ótico comum. As células da superfície queratinizada do epitélio, ricas em gorduras, coram-se de laranja, sendo denominadas células orangiófilas. O número de células aumenta com a maturidade da pele fetal: até a 34ª semana de gestação, menos de 1% de células orangiófilas são encontradas; entre a 34ª e 38ª semana observa-se 1% a 10% dessas células; entre a 38ª e 40ª semana, de 10% a 40%; e, acima de 40 semanas, mais de 40% de células orangiófilas são encontradas no líquido amniótico.

Testes para anomalias cromossômicas, distúrbios genéticos e defeitos congênitos

Análise cromossômica ou cariótipo

As anomalias cromossômicas associadas a diversos distúrbios são investigadas por exame citogenético denominado análise cromossômica ou cariótipo. Cariótipo é um conjunto diploide de cromossomos das células somáticas de um organismo. Seres humanos possuem 46 cromossomos, agrupados em 23 pares, sendo 22 pares autossômicos e um par alossômico sexual, o qual diferencia o gênero de um organismo em

masculino e feminino. A análise do cariótipo serve para identificar cromossomos com alterações numéricas e/ou estruturais. Como resultado da análise dos cromossomos, o sexo do feto pode ser determinado.

Diversas anomalias cromossômicas podem ser identificadas, entre elas:

- **Síndrome de Down ou Trissomia 21:** ocasionada pela presença de um cromossomo 21 extra.
- **Síndrome de Klinefelter:** causada por um cromossomo X extra. É a anomalia de cromossomos sexuais mais comum no sexo masculino.
- **Síndrome de Turner:** causada pela ausência de um cromossomo X em indivíduos do sexo feminino.
- **Síndrome de Edwards ou Trissomia 18:** causada pela presença de um cromossomo 18 extra, e associada a retardo mental grave.
- **Síndrome de Patau ou Trissomia 13:** causada por um cromossomo 13 extra.

É indiscutível a importância da análise cromossômica na determinação de anomalias, mas o exame pode não detectar 100% das alterações. Uma seleção clonal em células do líquido amniótico obtidas de cultura, assim como anomalias pós-zigóticas não visíveis de forma homogênea em todos os tecidos fetais podem impedir a identificação de algumas anomalias.

Testes genéticos

Doenças genéticas e hereditárias são pesquisadas através da análise genética ou molecular do líquido amniótico. O DNA fetal é analisado para que mutações genéticas específicas possam ser identificadas. Os testes genéticos podem ser solicitados com base no histórico familiar e pessoal dos pais. Devem ser realizados entre a 15ª e 20ª semana de gestação quando:

- A gestante tiver idade avançada.
- Foi detectada uma anomalia na ultrassonografia fetal.
- Houver história familiar de um distúrbio genético específico, ou um ou ambos os pais tiverem um distúrbio hereditário.
- A gestante apresentar uma anomalia na triagem pré-natal do primeiro trimestre ou na triagem pré-natal do segundo trimestre, como aumento ou diminuição dos níveis de alfafetoproteína.
- Outra criança da mesma mãe apresentar anomalia cromossômica ou defeito congênito.

Testes para defeitos congênitos

Defeitos do tubo neural, como a espinha bífida e a anencefalia, podem acarretar aumento da concentração de substâncias tais como alfafetoproteína e acetilcolinesterase no líquido amniótico.

Alfafetoproteína

A alfafetoproteína é a principal proteína produzida pelo fígado do feto no início da gestação, com pico entre a 16ª e a 18ª semana. Suas concentrações vão declinando até o final da gestação se o desenvolvimento fetal for normal. A alfafetoproteína é secretada na urina fetal, podendo ser dosada no líquido amniótico, e também pode ser encontrada no soro materno, devido à circulação compartilhada entre mãe e feto.

No caso de defeitos no tubo neural, a pele do feto não fecha sobre o tecido neural, e quantidades elevadas de alfafetoproteína são encontradas no líquido amniótico e no soro materno. Sua dosagem no líquido amniótico é indicada quando há histórico familiar de defeito do tubo neural ou as concentrações no soro materno estão muito aumentadas.

Em caso de gestações múltiplas, há aumento significativo na concentração de alfafetoproteína. Concentrações elevadas também estão presentes em outras malformações (defeitos da parede abdominal, obstrução urinária e outras anomalias renais, defeitos de osteogênese, defeitos congênitos de pele), na síndrome de Turner, em casos de obstrução esofágica ou intestinal, e necrose hepática. Concentrações diminuídas podem indicar trissomias cromossômicas, como síndrome de Down, doença trofoblástica gestacional, morte fetal e aumento do peso materno.

Acetilcolinesterase

Quando as concentrações de alfafetoproteína estão aumentadas no líquido amniótico é recomendada a determinação da acetilcolinesterase amniótica. Sua concentração aumenta na presença de defeitos do tubo neural e de outras anomalias anatômicas. É mais específica que a alfafetoproteína, mas a presença de sangue no líquido amniótico prejudica sua determinação, já que ela também está presente nas hemácias.

Testes de sofrimento fetal

O sofrimento fetal pode ser causado por diversas complicações obstétricas, tais como: infecções, síndrome da angústia respiratória do recém-nascido (SAR) e doença hemolítica do recém-nato ou eritroblastose fetal. Essas condições podem causar parto prematuro e aborto espontâneo. As já citadas variações de cor do líquido amniótico podem indicar sofrimento e até mesmo óbito fetal. Além de exames físicos, outros exames também são usados para detectar ou monitorar o sofrimento fetal.

Infecções podem ser detectadas pela coloração de Gram do material, cultura e testes moleculares. A SAR, causa mais comum de óbito em prematuros, pode ser prevista pela análise dos níveis de surfactantes pulmonares (veja Teste de maturidade pulmonar fetal). E a anemia hemolítica é usualmente avaliada pela determinação de bilirrubinas no líquido.

Bilirrubina

A doença hemolítica do recém-nato ou eritroblastose fetal acontece quando a mãe desenvolve anticorpos contra antígenos da hemácia do feto. Frequentemente, os anticorpos produzidos são contra o fator Rh (D) fetal, mas anticorpos contra os grupos sanguíneos ABO também podem desencadear a destruição das hemácias.

A produção desses anticorpos geralmente acontece porque a gestante foi exposta, em uma gestação anterior ou

durante uma transfusão sanguínea, a antígenos de hemácias diferentes daqueles presentes em suas próprias hemácias. Em uma gestação posterior, se as hemácias do feto tiverem esses antígenos, herdados do pai, haverá incompatibilidade materno-fetal e os anticorpos da mãe poderão destruir as hemácias fetais, provocando a anemia hemolítica do recém-nato.

A bilirrubina é um produto da degradação do heme, grupo prostético da hemoglobina. Na anemia hemolítica, grandes quantidades de heme são liberadas, e, consequentemente, haverá a formação de grandes quantidades de bilirrubina indireta ou não conjugada, que estarão presentes no líquido amniótico.

Em 1961, Liley propôs o uso da análise espectral do líquido amniótico para verificar a quantidade de bilirrubina fetal e assim predizer a gravidade da doença hemolítica do recém-nato. A determinação da bilirrubina no líquido amniótico pode ser feita a partir da 25ª semana de gestação, para avaliar a gravidade da anemia hemolítica do feto.

A quantificação da bilirrubina no líquido amniótico é feita por análise espectrofotométrica, em que a densidade ótica (DO) do líquido é medida entre 365 e 550 nm. Em 450 nm há um aumento na DO, já que é nesse comprimento de onda que ocorre máxima absorção da bilirrubina. Esse método é também conhecido como variação ou δ da densidade ótica em 450 nm (ΔDO450). Os resultados são plotados em papel semilogarítmico. Em um líquido amniótico normal a DO é maior em 365 nm, e vai reduzindo linearmente em 550 nm (Figura 13.2).

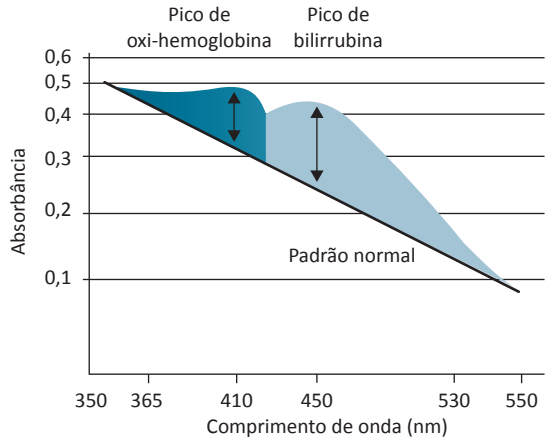


Figura 13.2 Varredura espectrofotométrica da bilirrubina em líquido amniótico. A diferença entre a DO do padrão normal e a DO em 450 nm (ΔDO450) representa a concentração de bilirrubina no líquido amniótico. O desvio da curva em relação à linha reta verde em 450 nm é diretamente proporcional à quantidade de bilirrubina. A oxi-hemoglobina é um contaminante e corresponde ao ΔDO410. Esse interferente pode ser eliminado com a centrifugação do líquido amniótico.
Fonte: Adaptada de Strasinger SK, Di Lorenzo MS., 2008.

A diferença de DO encontrada é plotada no gráfico de Liley para determinar a severidade da anemia do feto (Figura 13.3).

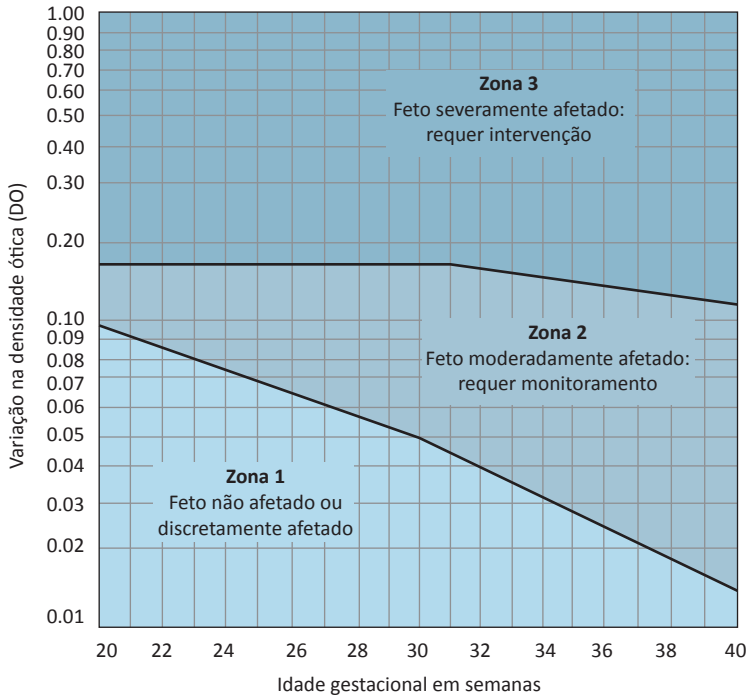


Figura 13.3 Exemplo de gráfico ou curva de Liley. O gráfico é dividido em três zonas: resultados dentro da zona I indicam anemia hemolítica ausente ou leve; resultados dentro da zona II indicam doença moderada, o feto deve ser monitorado a cada uma ou duas semanas; e resultados acima da zona II indicam comprometimento severo do feto, o que pode requerer intervenção como transfusão intrauterina ou parto.
Fonte : Adaptada de Strasinger SK, Di Lorenzo MS., 2008.

Não há um método padronizado para a determinação da bilirrubina no líquido amniótico pela variação da DO. Muitos laboratórios não utilizam o método originalmente descrito por Liley. Essas variações metodológicas não interferem significativamente nos resultados, no entanto, é importante lembrar que métodos que utilizam extração com clorofórmio podem dar resultados inferiores quando comparados às demais metodologias. E o uso da escala linear em substituição da logarítmica também pode fornecer resultados mais baixos.

Embora a determinação seriada da variação da DO a 450 nm (ΔDO450) seja o método mais comum para avaliar a severidade da doença hemolítica, a ultrassonografia Doppler ou Dopplervelocimétrica da artéria cerebral média é um método não invasivo, que pode ser utilizado para essa finalidade com resultados semelhantes.

Testes de maturidade pulmonar fetal

Os testes para avaliar a maturidade pulmonar fetal são feitos quando uma gestante tem risco elevado de parto prematuro ou quando um parto prematuro é necessário para preservar a saúde da mãe ou do recém-nato. Os exames se baseiam na determinação de substâncias que normalmente estão presentes nos pulmões maduros do feto, revestindo os alvéolos. Elas funcionam como detergentes, mantendo a tensão superficial dos alvéolos reduzida, permitindo que inflem com o ar, e impedindo que colabem durante a inspiração e expiração fetal. Essas substâncias são denominadas surfactantes pulmonares. Se houver um nível insuficiente de surfactante, o recém-nascido pode desenvolver a síndrome da angústia respiratória, com risco de vida.

Os componentes surfactantes presentes no líquido amniótico variam, dependendo da maturidade pulmonar do feto. Podem estar presentes fosfolipídios, incluindo lecitina, esfingomielina, fosfatidilglicerol, fosfatidillinositol e fosfatidiletanolamina, além de enzimas da via dos fosfolipídios, corpos lamelares e apolipoproteínas específicas do pulmão.

Os exames laboratoriais mais utilizados para avaliar a maturidade pulmonar fetal avaliam a presença desses surfactantes no líquido amniótico, e são divididos em: a) métodos bioquímicos para determinar surfactantes (relação lecitina/esfingomielina, relação lecitina saturada/lecitina total, determinação de fosfatidilglicerol, e palmitato/estearato); b) métodos biofísicos (teste de estabilidade da espuma ou de agitação, contagem de corpos lamelares); e c) testes indiretos (atividade tromboplástica, teste da fluorescência polarizada, e densidade ótica a 650 nm). A relação lecitina/esfingomielina e a dosagem de fosfatidilglicerol são considerados os exames mais recomendados para avaliar a maturidade pulmonar fetal.

Relação lecitina/esfingomielina (L/E)

A lecitina é o principal fosfolipídio surfactante pulmonar, e juntamente com a esfingomielina são produzidas em quantidades relativamente iguais até a 32ª ou 33ª semana de gestação. Após esse período, há um aumento significativo na produção de lecitina e redução da esfingomielina. A relação entre esses dois componentes do surfactante pode ser utilizada para avaliar a maturidade pulmonar. Após a 35ª semana de gestação, uma relação L/E ≥ 2,0 indica maturidade pulmonar. Valores inferiores a 1,6 refletem a baixa quantidade de lecitina, e, consequentemente, a possibilidade de colapso pulmonar no caso de parto prematuro.

A idade gestacional pode ser um preditor independente de SAR. Acima de 38 semanas, a SAR é rara, mesmo com relação L/E abaixo de 1,6. E, contrariamente, uma relação L/E ≥ 2,0 a probabilidade de ocorrer SAR pode ser alta, variando de 25% na 34ª semana, a 95% na 26ª semana. A relação L/E também não apresenta boa correlação com a maturidade pulmonar quando a mãe tem alguma condição patológica que acelere ou retarde a maturação fetal.

A quantificação da lecitina e da esfingomielina é feita por cromatografia em camada delgada, que apresenta um elevado coeficiente de variação analítica. A migração é assegurada por uma mistura de solventes polares (clorofórmio - metanol - água), que separa os diferentes lipídios. Sangue e mecônio no líquido amniótico são interferentes que podem causar resultados falsamente elevados. A determinação de outro fosfolipídio surfactante, o fosfatidilglicerol, pode ser uma alternativa com melhor custo-benefício.

Determinação de fosfatidilglicerol

A produção de fosfatidilglicerol acompanha a da lecitina e da esfingomielina, indicando maturidade pulmonar fetal. Nos casos de gestantes com diabetes, sua produção pode retardar; a relação L/E pode estar dentro do esperado (≥ 2,0), mas o pulmão do feto ainda pode não estar maduro.

Métodos enzimáticos, imunológicos e cromatográficos podem ser empregados para a determinação de fosfatidilglicerol. A cromatografia em camada delgada é o método mais utilizado, mas requer infraestrutura. Já o método imunológico Amniostat-FLM (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), que utiliza anticorpos específicos contra fosfatidilglicerol, é mais rápido e não é afetado pela presença de sangue e mecônio.

Teste de agitação ou estabilidade da espuma

Também conhecido como *Shake test* ou teste de Clements, é um teste de triagem para determinação de surfactante pulmonar no líquido amniótico. O teste fundamenta-se na capacidade dos fosfolipídios de reduzir a tensão superficial do líquido amniótico e formar bolhas, mesmo na presença de álcool, que é um agente antiespumante. Uma parte de líquido amniótico é misturada com uma parte igual de etanol a 95%, agitado vigorosamente por 15 segundos e deixado em repouso por 15 minutos. Após esse período, se houverem bolhas presentes é indicativo de quantidade suficiente de fosfolipídios no líquido amniótico.

O teste de estabilidade da espuma é uma variação do teste de agitação. Neste teste, 0,5 mL de líquido amniótico deve ser adicionado em 3 tubos contendo 0,5 mL de etanol com concentrações de 25%, 50% e 75%, respectivamente. Os tu-

bos são agitados durante 15 segundos e deixados em repouso por 15 minutos, para então ser analisada a presença de espuma contínua na borda dos tubos. É indicativo de maturidade fetal a presença de espuma estável na borda dos 3 tubos. A presença de espuma estável apenas no tubo 1 indica imaturidade fetal e a persistência nos tubos 1 e 2 sugere maturidade intermediária. Esse procedimento fornece uma medida semiquantitativa da quantidade de surfactante presente no líquido. Embora a sensibilidade deste teste seja de 98% a 100%, a sua especificidade é 85%. Sangue e mecônio também reduzem a tensão superficial do líquido, dando resultados falsamente elevados.

Contagem de corpos lamelares

Os corpos lamelares são estruturas fosfolipídicas que armazenam os surfactantes produzidos e secretados pelos pneumócitos fetais tipo II. Eles são formados a partir de vinte semanas de gestação e chegam ao líquido amniótico pelos movimentos respiratórios do feto. Portanto, o número de corpos lamelares presentes no líquido corresponde à quantidade de fosfolipídios presentes no pulmão do feto, e, consequentemente, o grau de maturidade fetal. Por volta do terceiro trimestre de gestação, a contagem de corpos lamelares atinge 50 mil a 200 mil corpos lamelares/mL de líquido amniótico.

Uma vez que o tamanho dos corpos lamelares é semelhante ao tamanho de uma plaqueta, eles podem ser facilmente quantificados através do canal de contagem de plaquetas dos analisadores hematológicos. Tem-se considerado 35 mil corpos lamelares/mL de líquido, um valor de corte para caracterizar maturidade pulmonar fetal. No entanto, como cada analisador utiliza um princípio de contagem de plaquetas, os valores de corte podem variar.

A técnica manual consiste em centrifugar o líquido amniótico a 1.500 rpm/10 minutos e determinar a DO do sobrenadante em 650 nm. Nesse comprimento de onda, uma DO de 0,150 ou mais corresponderia a uma relação lecitina/esfingomielina ≥ 2,0, e indicaria a presença de fosfatidilglicerol. O mecônio causa interferência discreta na determinação dos corpos lamelares por esta metodologia.

Teste da fluorescência polarizada

Os surfactantes reduzem a microviscosidade do líquido amniótico. Essa redução pode ser detectada através do ensaio TDx-FLM II (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). O teste avalia a relação surfactante/albumina (onde a albumina atua como padrão interno, pois sua concentração é constante durante toda a gestação), e a polarização fluorescente desses dois componentes.

Um corante fluorescente se liga aos surfactantes e também à albumina presentes no líquido amniótico. Quando ligado ao surfactante, o corante exibe um tempo de fluorescência longa e baixa polarização; e, quando ligado à albumina, a fluorescência é curta e a polarização é alta. Quanto maior a intensidade da polarização fluorescente, menor é a quantidade de surfactante, e, consequentemente, mais imaturo está o pulmão do feto.

As mudanças registradas na polarização fornecem uma relação surfactante/albumina, que é comparada com uma curva de calibração, padrão que varia de 0 a 160 mg/g de fosfatidilglicerol. Valores ≤ 39 mg/g refletem imaturidade pulmonar. Outros ensaios substituirão a fluorescência polarizada para determinação da maturidade pulmonar fetal, já que o fabricante pretende descontinuá-lo.

CONSIDERAÇÕES SOBRE A ANÁLISE LABORATORIAL DO LÍQUIDO AMNIÓTICO

Os resultados da análise do líquido amniótico podem não condizer com o estado geral de saúde do recém-nato. Existe uma pequena porcentagem de resultados falso-positivos ou negativos, o que significa que resultados normais não excluem todas as complicações que podem acometer o feto, assim como resultados alterados podem aparecer em fetos saudáveis.

A presença de altas concentrações de alfafetoproteína é um indicativo de defeitos do tubo neural. É possível reduzir o risco desses defeitos com suplementação de ácido fólico durante a gestação.

O aumento da concentração de bilirrubina no líquido amniótico indica doença hemolítica do recém-nato, que pode ser evitada com a administração de imunoglobulina anti-RH na gestante logo após o parto.

A análise de surfactantes reflete a maturidade pulmonar fetal, que quando estão em baixas concentrações de surfactantes mostram que os pulmões do feto ainda não amadureceram. Neste caso, o médico pode tentar adiar o parto para permitir o desenvolvimento pulmonar.

Já os defeitos genéticos e cromossômicos não podem ser evitados. Se alguma anomalia cromossômica ou algum defeito genético forem detectados, provavelmente o recém-nato terá a condição clínica associada. A gestante deve discutir os resultados de seus exames com o seu médico e, em alguns casos, é recomendado aconselhamento genético.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Adler SP. Screening for cytomegalovirus during pregnancy. Infect Dis Obstet Gynecol. 2011;2011:1-9.
2. Barbati A, Di Renzo GC. Main clinical analyses on amniotic fluid. Acta Biomed. 2004;75 Suppl 1:14-7.
3. Bailey DN, Briggs JR. Studies of the extraction of bilirubin from human amniotic fluid. Am J Clin Pathol. 2006;125(5):771-3.
4. Benoit J, Merrill S, Rundell C, et al. Amniostat-FLM: an initial clinical trial with both vaginal pool and amniocentesis samples. Am J Obstet Gynecol. 1986;154(1):65-8.
5. Bhat YR, Vinayaka G, Sreelakshmi K. Antenatal bartter syndrome: a review. Int J Pediatr. 2012;2012:857136.
6. Bizzoco D, Gabrielli I, Tamburrino C, et al. Discordance between karyotype from amniotic fluid and postnatal lymphocyte cultures. J Prenat Med. 2012;6(2):34-5.
7. Bianchi DW. From prenatal genomic diagnosis to fetal personalized medicine: progress and challenges. Nat Med. 2012;18(7):1041-51.
8. DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. Semin Fetal Neonatal Med. 2012;17(1):2-11.
9. DiGiulio DB, Gervasi M, Romero R, et al. Microbial invasion of the amniotic cavity in preeclampsia as assessed by cultivation and sequence-based methods. J Perinat Med. 2010;38(5):503-13.

10. Dubin SB. Characterization of amniotic fluid lamellar bodies by resistive-pulse counting: relationship to measures of fetal lung maturity. Clin Chem. 1989;35(4):612-6.
11. Gilbert JM, Taylor NF, McFadyen IR. A comparison between the lecithin/sphingomyelin ratio and the Nile blue sulphate test in the estimation of fetal maturity. Acta Obstet Gynecol Scand. 1977;56(5):491-3.
12. Ghi T, Pilu G, Falco P, et al. Prenatal diagnosis of open and closed spina bifida. Ultrasound Obstet Gynecol. 2006;28(7):899-903.
13. Has R, Yuksel A, Buyukkurt S, et al. Prenatal diagnosis of diastematomyelia: presentation of eight cases and review of the literature. Ultrasound Obstet Gynecol. 2007;30(6):845-9.
14. Liley AW. Liquor amnil analysis in the management of the pregnancy complicated by resus sensitization. Am J Obstet Gynecol. 1961;82:1359-70.
15. Halldorsdottir AM, Grenache DG, Snyder J, Chowning RT, Gronowski AM. Comparison of various methods for amniotic fluid DeltaOD450 bilirubin measurement. Clin Chim Acta. 2008;389(1-2):160-3.
16. Lee SM, Jun JK, Lee EJ, et al. Measurement of fetal urine production to differentiate causes of increased amniotic fluid volume. Ultrasound Obstet Gynecol. 2010;36(2):191-5.
17. Lockwood CM, Crompton JC, Riley JK, et al. Validation of lamellar body counts using three hematology analyzers. Am J Clin Pathol. 2010;134(3):420-8.
18. Magann EF, Chauhan SP, Sanderson M, et al. Amniotic fluid volume in normal pregnancy: comparison of two different normative datasets. J Obstet Gynaecol Res. 2012;38(2):364-70.
19. Modena AB, Fieni S. Amniotic fluid dynamics. Acta biomed. 2004;75 Suppl 1:11-3.
20. Morrison JC, Whybrew WD, Bucovaz ET. The L/S ratio and shake test in normal and abnormal pregnancies. Obstet Gynecol. 1978;52(4):410-4.
21. Mujezinovic F, Alfirevic Z. Technique modifications for reducing the risks from amniocentesis or chorionic villus sampling. Cochrane Database Syst Rev. 2012;8:CD008678.
22. Neagos D, Cretu R, Sfetea RC, et al. The importance of screening and prenatal diagnosis in the identification of the numerical chromosomal abnormalities. Maedica. 2011;6(3):179-84.
23. Nomura RM, Miyadahira S, Francisco RP, et al. [Assessment of fetal maturity in high risk pregnancies: analysis according to gestational age]. Rev Assoc Med Bras. 2001;47(4):346-51.
24. Oepkes D, Seaward PG, Vandenbussche FP, et al. Doppler ultrasonography versus amniocentesis to predict fetal anemia. N Engl J Med. 2006;355(2):156-64.
25. Pelikan DM, Mesker WE, Scherjon SA, et al. Improvement of the Kleihauer-Betke test by automated detection of fetal erythrocytes in maternal blood. Cytometry B Clin Cytom. 2003;54(1):1-9.
26. Schmidt-Sommerfeld E, Litmeyer H, Penn D. A rapid qualitative method for detecting phosphatidylglycerol in amniotic fluid. Clin Chim Acta. 1982;119(3):243-7.
27. Schubert R, Eggermann T, Hofstaetter C, et al. Clinical, cytogenetic, and molecular findings in 45,X/47,XX,+18 mosaicism: clinical report and review of the literature. Am J Med Genet. 2002;110(3):278-82.
28. Stimac T, Petrovic O, Krajina R, et al. Lamellar body count as a diagnostic test in predicting neonatal respiratory distress syndrome. Croat Med J. 2012;53(3):234-8.
29. St Clair C, Norwitz ER, Woensdregt K, et al. The probability of neonatal respiratory distress syndrome as a function of gestational age and lecithin/sphingomyelin ratio. Am J Perinatol. 2008;25(8):473-80.
30. Strasinger SK, Di Lorenzo MS. Urinalysis and body fluids. 5.ed. Philadelphia: FA Davis, 2008.
31. Tong XL, Wang L, Gao TB, et al. Potential function of amniotic fluid in fetal development---novel insights by comparing the composition of human amniotic fluid with umbilical cord and maternal serum at mid and late gestation. J Chinese Med Assoc. 2009;72(7):368-73.
32. Yera H, Filisetti D, Bastien P, et al. Multicenter comparative evaluation of five commercial methods for toxoplasma DNA extraction from amniotic fluid. J Clin Microbiol. 2009;47(12):3881-6.

14

capítulo

Samuel Ricardo Comar
Gisele Maria Buczenko Singer
Mauren Isfer Anghebem
Angela Maria de Souza
Sérgio Monteiro de Almeida

Líquido Cefalorraquidiano – LCR

LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

Introdução

A análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) é uma ferramenta fundamental para a obtenção de informações diagnósticas relevantes para uma série de doenças do sistema nervoso (Ennis; Keep, 2006; Weaver *et al.*, 2004; Johanson *et al.*, 2008). Como está em contato íntimo com o parênquima encefálico e a medula espinhal, sua investigação traz importantes informações sobre alterações no microambiente neuronal. O LCR pode ser considerado, de certa forma, uma biópsia líquida do cérebro. Do ponto de vista diagnóstico, sua coleta está indicada em processos infecciosos e não infecciosos no SNC. O objetivo deste capítulo é fornecer uma visão atual e contemporânea da análise do LCR para profissionais de laboratório, clínicos e todos aqueles que se interessam pela interpretação do LCR.

História

A presença de um fluido no interior da cavidade cerebral é conhecida desde tempos remotos. No século IV a.C. o pai da Medicina, Hipócrates, registrou a presença de um fluido dentro do cérebro e também realizou a primeira punção ventricular *post mortem* em um paciente com hidrocefalia. Contudo, somente no início do século XIX começaram as primeiras análises sistemáticas do líquido cefalorraquidiano (LCR). Ao médico francês François Magendie (1783-1855) é creditado o nome *liquide cérébro-spinal* por meio de seu trabalho, que estabeleceu a existência de uma comunicação ventricular para o espaço subaracnoide. Em 1855, o anatomista alemão Hubert von Luschka (1820-1875) descreveu detalhadamente os ventrículos cerebrais, os espaços subaracnoides, o LCR e o plexo coroide. Ele também aplicou técnicas experimentais para determinar os aspectos dinâmicos do LCR. Em 1875, Axel Key e Gustaf Retzius fizeram descrições detalhadas das membranas e das cavidades do interior do cérebro e da medula espinhal. Com o emprego de corantes, eles estabeleceram que o LCR fluía dos ventrículos para o espaço subaracnoide por meio de pulsações do plexo coroide que impulsionavam o LCR até ser absorvido pelas granulações aracnoides para dentro dos seios venosos. Também confirmaram a existência do forame lateral de Luschka e do forame medial de Magendie os quais, somados ao forame de Monro e do aqueduto de Sylvius, possibilitam a circulação e a distribuição do LCR entre os ventrículos e destes para o espaço subaracnoide que envolve o cérebro e a medula espinhal. A Heinrich Irenäus Quincke foi creditada a realização da punção lombar (PL) em 1891 assim como sua introdução na prática clínica para fins diagnósticos. No começo do século XX muitos trabalhos foram realizados para descrever as características do LCR em várias doenças. Muitos dos relatos clínicos sobre LCR publicados antes da Segunda Guerra Mundial foram sobre neurosífilis, meningite bacteriana aguda e tuberculosa, e a ênfase nessas doenças impactou enormemente na análise de rotina realizada nos dias atuais (Key; Retzius, 1873; Albright Jr, 1991; Frederiks; Koehler, 1997). A evolução do estudo do LCR no Brasil é revisada por Livramento e Machado (2013).

FORMAÇÃO, CIRCULAÇÃO, FUNÇÕES E COMPOSIÇÃO

O LCR é um fluido corporal estéril e de aparência clara que ocupa o espaço subaracnoide, situado entre as membranas aracnoide e pia mater e circula pelos hemisférios cerebrais e medula espinhal. O LCR é um fluido cristalino estéril produzido pelas células do plexo coroide dos ventrículos laterais do cérebro e em menor proporção pelo plexo coroide do terceiro e do quarto ventrículos cerebrais. Uma pequena parte é produzida em locais extracoroidais, como o epitélio ependimário dos ventrículos e o espaço subaracnoide cerebral. A produção é realizada de duas maneiras, onde na primeira observa-se filtração passiva do sangue pelo endotélio capilar coroidal, que é o tecido que constitui o plexo coroide, e que é diretamente proporcional ao gradiente entre a pressão hidrostática do sangue e do fluido intersticial coroide. Já na segunda maneira, que é modulada neuroen-

dócrina e hormonalmente, ocorre um processo de secreção ativa pelo epitélio colunar ependimário simples e secretor dos ventrículos que envolve bombas transportadoras, canais iônicos e aquaporinas. O LCR é reabsorvido para a corrente circulatória por meio das granulações aracnoides, que são evaginações da membrana aracnoide compostas por células endoteliais especializadas e que estão associadas aos seios venosos, representando a interface entre o sangue o LCR (Johanson *et al.*, 2008; OSHIO *et al.*, 2005; Weaver *et al.*, 2003; Torzewski et al, 2008; Galagan *et al.*, 2006; Blomberg *et al.*, 2012; Hussong; Kjeldsberg, 2015).

O fluxo do LCR é pulsátil e essa pulsação depende da hemodinâmica arterial no plexo coroide. Esse fluxo ocorre dos ventrículos laterais, passando pelo orifício de Monro, para o terceiro, descendo, em seguida ao quarto ventrículo, através do aqueduto de Sylvius. Do quarto ventrículo, passando pelos forames de Magendie e Luschka, segue até as cisternas basais e, posteriormente, aos espaços subaracnoides espinhal e cortical. Além da macrocirculação através do espaço ventricular subaracnoide, há uma limitada microcirculação que segue do espaço subaracnoide até o espaço subpial de Virchow-Robin que, por sua vez, permite a eliminação de parte do LCR presente no cérebro por vias de drenagem. A eliminação ou reabsorção do LCR do SNC ocorre principalmente por desvios existentes no espaço subaracnoide, predominantemente ao longo do seio sagital superior, chamados de vilosidades aracnoides, as quais cercam nervos cranianos. A eliminação do LCR também ocorre pela placa cribriforme, ocasionando, assim, o retorno do LCR para a circulação venosa. Todo este trajeto exige aproximadamente 1 hora para ser completado e o fluxo é mais rápido no sentido da gravidade (Egnor *et al.*, 2002; Stoquart-Elsankari *et al.*, 2007; Johanson *et al.*, 2008; Rennels *et al.*, 1990; Proescholdt *et al.*, 2000; Torzewski et al, 2008; Boulton *et al.*,1999; Zakharov *et al.*, 2004; Luedemann *et al.*, 2002; Miyajima; ARAI, 2015).

Funções do LCR

O LCR apresenta várias funções como suporte físico, fornecimento de nutrientes essenciais ao cérebro, a remoção de produtos da atividade catabólica neuronal do SNC, a proteção mecânica das células cerebrais onde atua como um amortecedor para o córtex cerebral e a medula espinhal, além de ser um veículo de transporte de substâncias biologicamente ativas, principalmente no sistema hipotálamo hipofisário (Jones, 2006; Skipor; Thierry, 2008; Johanson *et al.*, 2008; Redzic *et al.*, 2005; Silverberg *et al.*, 2001).

COLETA DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO E CUIDADOS PRÉ-ANALÍTICOS

Locais de coleta da amostra

A coleta de LCR é um procedimento médico invasivo, realizada após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo paciente ou por seu representante legal, de acordo com a Resolução nº 196 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), de 10 de outubro de 1996 (SOHLER *et al.*, 2002). A coleta de LCR deve ser realizada por médico devidamente treinado.

O local de coleta é preferencialmente a região lombar, mas pode ser feita em outros locais como suboccipital ou cisternal, ventricular (procedimento neurocirúrgico ou crianças com fontanela aberta até aproximadamente 1 ano e meio de idade) e cervical lateral (Fishman, 1992; Puccioni-Sohler *et al.*, 2002).

Indicações para coleta e análise de LCR

A coleta de LCR está indicada nos processos infecciosos do sistema nervoso e seus envoltórios; processos granulomatosos com imagem inespecífica; doenças desmielinizantes; estadiamento e tratamento de leucemias e linfomas, e profilaxia de envolvimento do SNC; imunodeficiências; processos infecciosos com foco não identificado; hemorragia subaracnoídea; diagnóstico e avaliação prognóstica de hidrocefalia de pressão normal (*tap test*). Como tratamento, a punção lombar está indicada para aplicação de medicação intratecal para profilaxia do SNC nas leucemias e linfomas; tratamento da hipertensão intracraniana por punção repetida no caso de meningite por *Cryptococcus* spp. (Amercian Academy Of Neurology, 2005).

Contraindicações para coleta de LCR

A punção liquórica eletiva deve ser realizada sempre após a realização de um exame de imagem por tomografia axial computadorizada ou ressonância nuclear magnética. Exceção são os casos com suspeita de meningite bacteriana aguda.

Todas as contraindicações para coleta de LCR são relativas. A contraindicação mais importante para a coleta de LCR é a presença de hipertensão intracraniana principalmente relacionada com lesões ocupando espaço.

Infecções locais da pele ou presença de escaras no local de punção podem ser contraindicações para realizar uma punção de LCR, e outro nível da coluna lombar pode ser utilizado para o procedimento (Engelborghs *et al.*, 2017).

Coagulopatias, diáteses hemorrágica e o uso de medicação anticoagulante são contraindicações relativas e devem ser corrigidas antes da punção lombar. Caso haja história ou suspeita clínica, o estado de coagulação do paciente (RNI <1,5) e a contagem de plaquetas (> $40 \times 10^3/\mu L$) devem ser verificados por meio de exame laboratorial recente antes da punção.

Cuidados pré-analíticos na coleta de LCR

O LCR deve ser coletado em tubos estéreis, sem anticoagulante, em no mínimo três tubos devidamente identificados. A identificação do material deve conter nome, número de registro do paciente e a data da coleta. O local da coleta de LCR deve ser registrado na requisição, uma vez que os valores de referência dos parâmetros citológicos e bioquímicos variam de acordo com o local da punção (Fishman, 1992).

A amostra do primeiro tubo deve ser encaminhada para análises bioquímicas e sorológicas; o segundo tubo será utilizado para os exames microbiológicos, e o terceiro tubo destina-se às contagens celulares devido a menor probabilidade de conter células sanguíneas, introduzidas acidentalmente no momento da punção. Tubos adicionais podem ser coletados para microbiologia ou outros teses. No caso de amostras encaminhadas para bacteriologia, coletar em tubos de transporte com Ágar chocolate.

A Tabela 14.1 mostra os tubos de coleta do LCR e os requisitos das amostras, respectivamente.

O sobrenadante do LCR após as análises não deve ser descartado e pode ser utilizado para análise bioquímica ou sorologias, e pode ser congelado para análises futuras.

Nos casos em que a amostra tenha sido coletada em apenas um único tubo, este deve ser enviado primeiramente para o Laboratório de Microbiologia, em seguida ao Laboratório de Hematologia e, por fim, ao Laboratório de Imunoquímica.

Amostras para realização de métodos de biologia molecular devem ser coletadas em tubos estéreis livres de enzimas que possam destruir o material nucleico (DNAse ou RNAse).

A amostra recém-colhida de LCR deve chegar ao laboratório o mais rápido possível para que os testes sejam realizados, idealmente, em caráter de urgência. Após 2 horas pode ocorrer degradação ou alterações morfológicas de hemácias, leucócitos e outros tipos celulares, além de diminuição da glicose, aumento na concentração das proteínas e de bactérias. Caso as análises não possam ser realizadas imediatamente, para a análise citológica a temperatura de armazenamento do LCR deve estar entre 5°C e 12°C para minimizar danos às células, mas não congeladas. Temperaturas muito baixas podem conduzir à lise pelo frio, enquanto que temperaturas mais altas aceleram mecanismos catabólicos, degenerando as células. Para as análises imunoquímicas as amostras podem ser congeladas; para as análises microbiológicas os tubos devem permanecer em temperatura ambiente. Amostras refrigeradas não são recomendadas para cultura de microrganismos pois as bactérias fastidiosas como *Haemophilus influenza* e *Neisseria meningitidis* não sobrevivem a baixas temperaturas (HENRY, 2008; MELO *et al.*, 2003; Torzewski *et al.*, 2008; Comar *et al.*, 2009; Strasinger; Di Lorenzo, 2009).

Volume de LCR a ser coletado

O volume de LCR que pode ser removido baseia-se no volume total disponível e difere no paciente adulto ou recém-nato. O volume total é de 100 a 250 mL em adultos, em recém-natos é de 6 a 60 mL. O volume de LCR normal em crianças acima de um ano de idade é considerado próximo ao do adulto. No primeiro ano de vida o *perímetro cefálico*, que reflete o tamanho do encéfalo, chega a atingir 84% do tamanho do *adulto, portanto, acima de um ano de idade o volume de LCR coletado pode ser o mesmo do adulto*.

O LCR é produzido a uma taxa de 20 mL/hora ou 0,35 mL/minuto. Uma vez que a produção e a reabsorção do LCR são constantes, a renovação do LCR no SNC também é constante, mudando completamente a cada 6-7 horas, sendo diretamente proporcional à taxa de formação. Ademais, sua constante produção atinge cerca de 500 mL/dia (FISHMAN, 1992; Seehusen *et al.*, 2003; Johanson *et al.*, 2008; Pinto, 2009; Silverberg *et al.*, 2003; Sotelo *et al.*, 2001; Silverberg *et al.*, 2001; Pople, 2002; Clsi, 2006; Macchiaverni; BARROS Filho, 1998).

Tabela 14.1 Requisitos da amostra para análise de LCR.

Teste	Anticoagulante	Volume	Comentários
Bioquímicos (proteína, glicose e etc)	Nenhum	3-5 mL	**Tubo #1**. Contém resíduos da punção e ocasionalmente sangue em uma punção traumática. Uma vez que é mais provável que seja contaminado com bactérias, fluido de tecido e células sanguíneas que possam produzir resultados enganosos, não deve ser utilizado para microbiologia e hematologia
Microbiológicos (coloração de Gram e cultura)	Nenhum	3-5 mL	**Tubo #2**. Pode conter alguns contaminantes das células do sangue, mas é adequado para estudos microbiológicos
Citológicos (contagem global e diferencial de células)	Nenhum	3-5 mL	**Tubo #3**. Tem a menor contaminação celular e, portanto, deve ser utilizado para contagens celulares global e diferencial de leucócitos
Outros testes (citologia oncótica, biologia molecular)	Nenhum	3-5 mL	**Tubo #4**. Pode ser utilizado para a pesquisa de células neoplásicas

Fonte: CLSI (2006).

ANÁLISE LABORATORIAL DO LCR

Características físicas

O exame macroscópico do LCR deve ser realizado logo após a chegada da amostra no laboratório e inclui observações de aspecto, cor da amostra pura, cor do sobrenadante, formação de coágulos e presença de película. O volume colhido deve ser registrado, assim como a cor e o aspecto antes e após a centrifugação. A presença de coágulo também deve ser relatada (Melo *et al.*, 2003).

Pressão

A medida da pressão intracraniana faz parte do exame do LCR, deve ser medida com o paciente em decúbito lateral, direito ou esquerdo, em repouso, relaxado, membros inferiores estendidos ou relaxados para evitar pressão abdominal pela flexão dos membros inferiores. A pressão intracraniana é medida com raquimanômetros em mmH_2O antes da coleta do LCR para a análise laboratorial. A pressão inicial e final devem ser medidas. Valores normais da pressão intracraniana variam de 100 a 200 mm de H_2O ou 7,5 a 15 mm de Hg. Para converter mm de Hg para mm H_2O = mm de Hg × 13 (Seehusen *et al.*, 2003; Henry, 2008; Hussong; Kjeldsberg, 2015; Strasinger; Di Lorenzo, 2009).

Aspecto e cor

A terminologia utilizada para descrever o aspecto do LCR inclui: límpido, discretamente turvo, turvo, oleoso, purulento/leitoso, xantocrômico e hemorrágico. Um aumento nas contagens de células causa turbidez, que é notada quando as contagens de células se aproximam de 200/µL. Ocasionalmente, o LCR poderá ter um aspecto oleoso devido à presença de meios de contraste radiológico. A turbidez também se torna perceptível com o aumento de microrganismos, lipídios e proteínas presentes na amostra. Os lipídios resultam em decorrência do embolismo gorduroso ou da aspiração de lipídios durante a punção.

O LCR normal é incolor e límpido, com viscosidade semelhante à da água. A cor do LCR deve ser relatada como incolor, amarelo, laranja, rosa/vermelho ou marrom/âmbar. Amarelo e laranja correspondem à bilirrubina, rosa à oxi-hemoglobina e marrom à meta-hemoglobina. Embora vários pigmentos possam ser identificados com base em suas "impressões digitais" únicas de absorção espectrais e quantificados por espectrofotometria, isso não é realizado rotineiramente pelos laboratórios clínicos (CLSI, 2006; Gall, 1998; Strasinger; Di Lorenzo, 2009; Mundt; Shanahan, 2012).

Quando a punção lombar é realizada dentro das primeiras 4 horas após uma hemorragia subaracnoide, o LCR possuirá aspecto hemorrágico (róseo/vermelho), dependendo do grau da hemorragia. Os eritrócitos são lisados no LCR em virtude da baixa concentração de proteínas e lipídios em comparação ao plasma. Após a hemólise, o LCR muda de róseo/vermelho turvo para róseo/vermelho límpido e, logo em seguida, para vários tons de amarelo, laranja e marrom/âmbar caracterizando a xantocromia, à medida que a oxi-hemoglobina é convertida em meta-hemoglobina e, também, à medida que a degradação do grupamento heme da hemoglobina origina a bilirrubina, que ocorre cerca de 2 a 12 horas após a hemólise inicial. A diminuição gradativa da xantocromia do LCR ocorre ao longo dos primeiros dias, tornando-se límpido em cerca de 2 a 4 semanas. Outras causas de xantocromia incluem: aumento sistêmico de bilirrubinas, proteínas no LCR elevadas (> 150 mg/dL), contaminação com componentes de iodo durante cirurgia; compostos contendo brometo, hipercarotenemia, rifampicina, melanina produzida por melanoma meníngeo (CLSI, 2006; Strasinger; DI Lorenzo, 2009; Petzold *et al.*, 2006).

A avaliação da xantocromia pode ser realizada por meio de comparação visual do sobrenadante da amostra de LCR centrifugada com uma solução de bicromato de potássio em concentrações variadas conforme Tabela 14.2, Figura 14.1 e Tabela 14.3. A intensidade da xantocromia também pode ser obtida por métodos espectrofotométricos ou método comparativo visual (bicromato de potássio). Este último, apesar de prático, apresenta baixa sensibilidade, 47% (Arora *et al.*, 2010; Reis, 1980).

Tabela 14.2 Preparo de solução de bicromato de potássio para avaliação de xantocromia em LCR.

Índice de cor	Sol. de bicromato de potássio 1/100 (Ml)	Sol. de bicromato de potássio 1/1.000 (Ml)	H_2O (mL)
100	10	-	-
50	5	-	5
10	1	-	9
5	0,5	-	9,5
3	0,3	-	9,7
1	0,1	-	9,9
0,5	-	0,5	9,5
0,3	-	0,3	9,7
0,1	-	0,1	9,9
0	-	-	10

Fontes: Kjeldsberg; Knight (1993); Jerrard *et al.* (2001); Arora *et al.* (2010).

Presença de coágulos

O LCR não coagula tanto em situações normais como na hemorragia subaracnoide, contudo, os coágulos podem estar associados a uma punção traumática. Coágulos e películas podem se formar em situações com elevação extrema de proteínas como na síndrome de Froin ou nas meningites

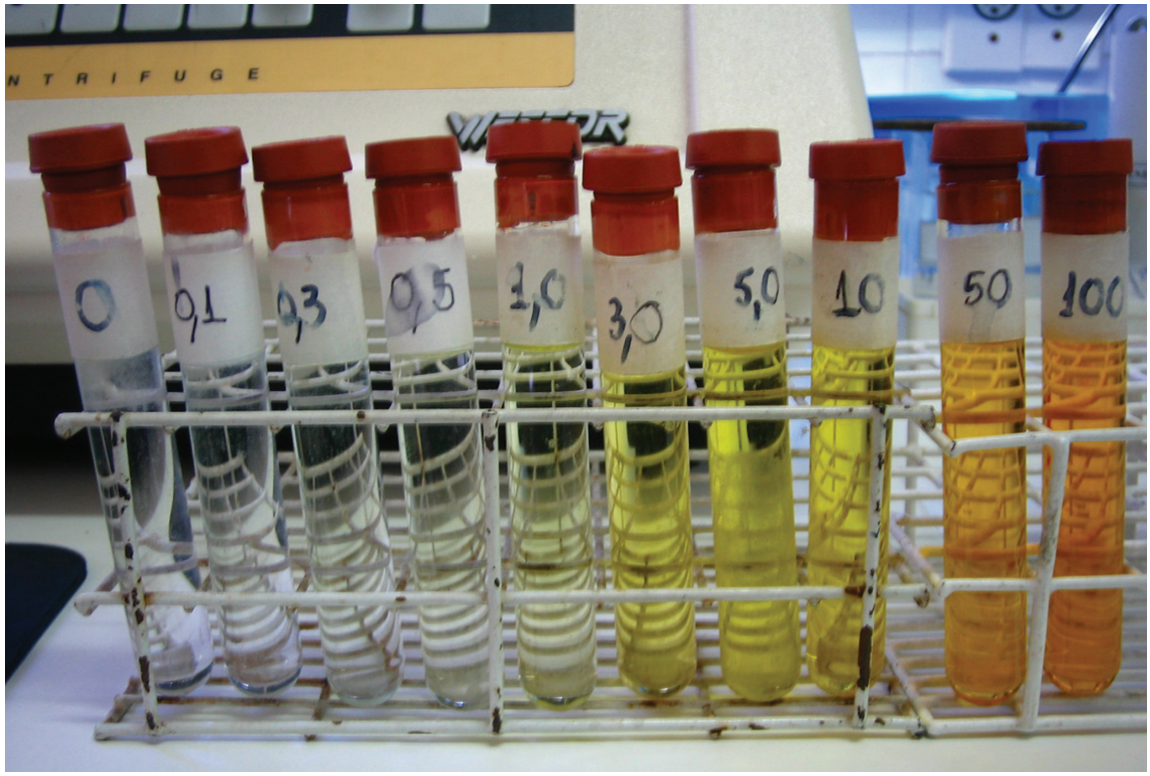


Figura 14.1 Solução de bicromato de potássio em índices de cor crescentes.
Fonte: Os autores.

Tabela 14.3 Interpretação da análise de xantocromia pelo índice de cor.

Cor do sobrenadante do LCR, causas e condições associadas	
Índice de cor	**Condição ou causa**
0	Normal
0,1-10	Hiperbilirrubinemia Produtos de degradação da hemoglobina Proteínas do LCR aumentadas
50-100	Alta ingestão de carotenoides Produtos de degradação da hemoglobina

Fonte: Kjeldsberg; Knight (1993).

bacterianas agudas e tuberculosa (retículo de Mya). A presença de coágulos pode interferir na exatidão da contagem de células por aprisioná-las (CLSI, 2006; Gall, 1998; Strasinger; Di Lorenzo, 2009).

Diagnóstico diferencial de hemorragia subaracnoide e acidente de punção

O LCR normal não apresenta hemácias. Na presença de hemácias é importante o diagnóstico diferencial entre acidente de punção e hemorragia subaracnoídea (HSA). Acidente de punção ocorre quando a agulha de punção lombar atinge um vaso no momento da coleta de LCR e as hemácias são introduzidas acidentalmente. O número de hemácias pode variar de poucas a milhares, por isso a quantidade de hemácias no LCR não auxilia no diagnóstico diferencial.

No acidente de punção, quando o LCR for coletado em três tubos (prova dos três tubos), a cor e o aspecto são diferente nos três tubos. Não é necessário realizar a contagem nos tubos, mas se realizada, a contagem de eritrócitos no último tubo deverá ser significativamente menor ou maior do que a contagem do primeiro tubo. Após a centrifugação, o sobrenadante é límpido e incolor e há presença de coágulo. Por outro lado, na HSA na prova dos três tubos, cor e aspecto igual nos três tubos, róseo ou vermelho; se realizada a contagem de eritrócitos no primeiro e último tubo, esta é similar nos tubos. Após centrifugação, no sobrenadante xantrocrômico há ausência de coágulo. A somatória destas três características auxilia no diagnóstico diferencial da maior parte dos casos. Outras características podem auxiliar no diagnóstico diferencial como a presença de macrófagos com pigmentos

de hemossiderina (Figuras 14.33 A e B) ou, mais tardiamente, de cristais de hematoidina (Figura 14.35), sugestivos de HSA.

A quantificação de hemoglobina e bilirrubina por análise espectrofotométrica do LCR, é considerada por alguns autores como o melhor método para separar acidente de punção de HSA. No acidente de punção há maior proporção de hemoglobina do que bilirrubina e na HSA a proporção é ao contrário (Marlet *et al.*, 1982; Petzold *et al.*, 2006).

Após HSA, o LCR exibe xantocromia como resultado do aparecimento de hemoglobina, meta-hemoglobina e bilirrubina. A bilirrubina deriva da hemoglobina degradada, portanto, quando a concentração de bilirrubina aumenta, a concentração de hemoglobina diminui.

A análise espectrofotométrica do LCR permite também indicar o momento em que a HSA ocorreu; o tempo decorrido do começo da hemorragia subaracnoide até o momento da análise do LCR pode ser obtido da relação entre as quantidades destes dois pigmentos mensurados por espectrofotometria. Na região entre 400 e 500 nm, a absorção máxima da oxi-hemoglobina e da bilirrubina ocorre em 412 nm e 480 nm, respectivamente (Marlet; Barreto Fonseca, 1982). O nomograma de Kronholm e Lintrup (1960) é utilizado para calcular a concentração de oxi-hemoglobina e bilirrubina, expressa em micromoles por litro (Figura 14.2).

Após a leitura da amostra de LCR em 412 e 480 nm em um espectrofotômetro, com o auxílio do nomograma da Figura 14.2, traça-se uma linha entre ambas as absorbâncias para obtenção das concentrações de hemoglobina e de bilirrubina. Com as duas concentrações calcula-se o Índice Hemoglobina-Bilirrubina (HBI) da seguinte maneira:

$$\textbf{HBI} = \frac{\text{Concentração de hemoglobina (µmoles/L)}}{\text{Concentração de bilirrubina (µmoles/L}}$$

A Tabela 14.4 mostra os valores médios de HBI correspondentes a vários tempos decorridos após a ocorrência da hemorragia subaracnoide.

Um fator que pode dificultar o diagnóstico diferencial é a demora na análise da amostra do LCR, ou nos casos em que uma punção traumática se sobrepõe à HSA, e a presença de sangue no último tubo seja, verdadeiramente, devido à HSA (CLSI, 2006; Gall, 1998; Strasinger; Di Lorenzo, 2009).

Algumas características não auxiliam no diagnóstico diferencial de HSA e no acidente de punção como macrófagos com hemácias integras (Figura 14.32), o número total de hemácias, presença de hemácias crenadas, aumento da pressão intracraniana, aumento de proteína total do LCR.

Nos casos duvidosos, a coleta de nova amostra de LCR após a amostra com acidente de punção, mesmo que coletada no nível de punção diferente, não tem valor para auxiliar no diagnóstico diferencial, pois suas características serão as mesmas da HSA. O acidente de punção nada mais é que uma HSA iatrogênica. Muitas vezes, o número de hemácias introduzido acidentalmente é tão grande que o paciente pode

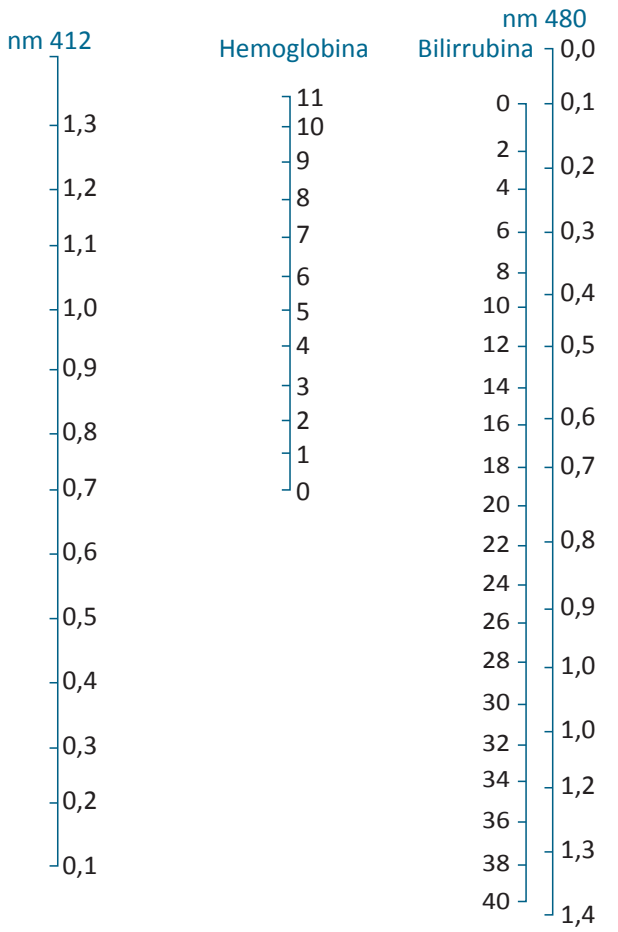


Figura 14.2 Nomograma para cálculo das concentrações de hemoglobina e bilirrubina, em micromoles por litro, derivados das absorbâncias em 412 e 480 nm.
Fonte: Kronholm; Lintrup (1960).

apresentar toda a clínica de HSA, cefaleia, rigidez de nuca e, em alguns casos, até febre.

Correção de células e proteína total no LCR após acidente de punção

a punção traumática pode introduzir células sanguíneas no LCR, e o mesmo pode ocorrer com as proteínas plasmáticas. No caso de acidente de punção é possível corrigir o número de células totais no LCR, pela fórmula:

$$\text{Leucócitos esperado}_{LCR} = \frac{\text{Leucócitos}_{LCR} - [\text{Leucócitos}_{Sangue} \times \text{Hemácias}_{LCR}}{\text{Hemácias}_{sangue}}$$

ou

Tabela 14.4 Valores médios de HBI conforme o tempo em dias decorridos após a hemorragia subaracnoide.

Dias após a hemorragia	HBI
0	0,22
1	14,07
2	24,04
3	8,63
4	4,46
5	2,82
6	1,62
7	0,91
8	0,39
9	0,37
10	0,37
11	0,40
12	0,37
13	0,32
14	0,26

Fonte: Marlet; Barreto Fonseca (1982).
Legenda: HBI: Índice Hemoglobina-Bilirrubina.

$$\text{Leucócitos}_{\text{LCR esperado}} = \frac{\text{Leucócitos}_{\text{LCR}}}{\text{Hemácias}_{\text{LCR}} \times \text{Hemácias}_{\text{sangue}} / \text{Leucócitos}_{\text{Sangue}}}$$

Com relação à proteína total, no caso de acidente de punção, é possível corrigir a proteína total do LCR, pelas fórmulas:

$$\text{Proteína}_{\text{LCR esperada}} = \frac{\text{Proteína}_{\text{LCR}} - (\text{Proteína}_{\text{Soro}} \star 1.000 \star (1 - \text{HCT}/100) \star \text{Hemácias}_{\text{LCR}}}{\text{Hemácias}_{\text{sangue}} \star 1e6}$$

ou

$$\text{Proteína}_{\text{LCR esperada}} = \frac{\text{Proteína}_{\text{LCR}}\,(\text{mg/dL}) - \text{Hemácias}_{\text{CSF}}\,(/\text{uL})}{333 \times 5{,}25}$$

Fonte: (Reske *et al.* 1981)

Em pacientes com valores normais de leucócitos e hemácias no sangue periférico, do ponto de vista prático, costuma-se subtrair uma célula do número total de células do LCR ou 1 mg/dL de proteína total o LCR, para cada 700 a 1.000 hemácias/mm³ no LCR (Nigrovic *et al.*, 2011; Seehusen *et al.*, 2003).

Nos casos de HSA não é possível corrigir o número de células totais ou proteína total do LCR, pois a presença do sangue no espaço subaracnoídeo causa meningite química, alterando esses valores.

Avaliação celular

A análise celular do LCR deve ser realizada logo que possível e a amostra **não centrifugada** e não congelada, devidamente homogeneizada para a contagem global de leucócitos e eritrócitos em câmara. A amostra deve ser diluída em solução salina (NaCl 0,9%), caso apresente elevada celularidade, a fim de que as células tenham um espaço adequado para se espalharem e, assim, formar uma monocamada na superfície da câmara, com sobreposição mínima. Na contagem diferencial de células, a amostra utilizada para confecção da lâmina deve ser total ou o sedimento obtido por centrifugação em baixa rotação. A preparação da lâmina deve ser rápida, já que as células se deterioram rapidamente em virtude do LCR ser um meio inapropriado para a manutenção da viabilidade das células. O pH elevado e a baixa pressão oncótica fazem com que algumas células inchem, algumas lisem e outras se tornem irreconhecíveis (Torzewski *et al.*, 2008; Comar *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2001).

Contagem global de células

A contagem global de leucócitos e eritrócitos no LCR pode ser realizada em qualquer tipo de câmara de contagem, porém, rotineiramente a câmara mais utilizada é a de Fuchs-Rosenthal (Figura 14.3) a qual tem uma altura de 0,2 mm, uma área total de 16,0 mm², um volume total de 3,2 mm³ e é dividida em 16 quadrados maiores que são subdivididos em 16 quadrados menores, sendo o procedimento para contagem global de células variável de acordo com a celularidade da amostra (Tabela 14.5) (Comar *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2001).

Para a diferenciação das hemácias, leucócitos e células teciduais durante a contagem na câmara de Fuchs-Rosenthal, deve-se conhecer as características de cada uma dessas células. Os eritrócitos se apresentam com um contorno regular, com halos e o centro da célula é limpo. Projeções finas e pontudas podem aparecer nos casos de eritrócitos crenados. Os leucócitos, por sua vez, apresentam um aspecto granular e são levemente refringentes. Pode também ocorrer a presença de células teciduais, geralmente grandes e granulares e com contorno irregular, as quais não devem ser inclusas na contagem, assim como as células lisadas (Comar *et al.*, 2009; Kjeldsberg; Knight, 1993).

Contagem diferencial de células

As células presentes no LCR, devido ao seu pequeno número, devem ser concentradas para a contagem diferen-

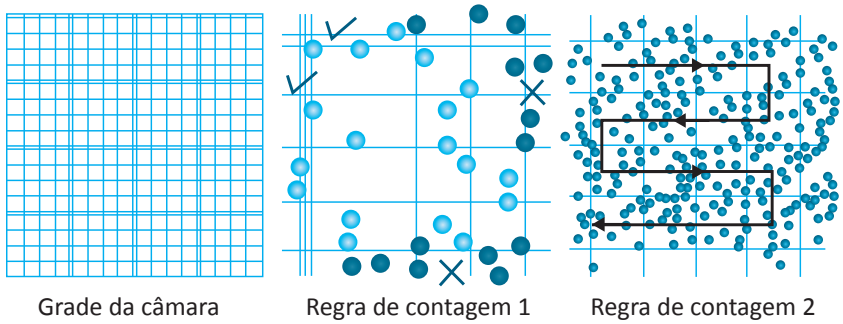


Figura 14.3 Câmara de Fuchs-Rosenthal.

Tabela 14.5 Procedimento de contagem global de células em câmara de Fuchs-Rosenthal, de acordo com a celularidade presente na amostra.

Celularidade	Procedimento de contagem
Baixa	Contar os 16 quadrados maiores e dividir por 3,2
Intermediária	Contar 4 quadrados maiores, multiplicar por 4 e dividir por 3,2
Alta	Contar um quadrado maior, multiplicar por 16 e dividir por 3,2
Altíssima (sobreposição de células)	Fazer diluição com salina ou líquido de Türk (para leucócitos), e multiplicar o resultado final pelo fator da diluição
Alta quantidade de hemácias	Contar um quadrado menor, multiplicar por 256 e dividir por 3,2

Fonte: COMAR, 2009.

cial ou a identificação de células malignas. Vários métodos de concentração são descritos. Os componentes celulares no CSF podem ser concentrados por sedimentação, filtração por membrana ou centrifugação em uma centrífuga de laboratório padrão ou uma citocentrífuga, embora vários estudos tenham investigado qual método de concentração (sedimentação *vs.* citocentrifugação) é melhor para a preparação de espécimes de LCR para diagnóstico de citologia, principalmente em casos de malignidade suspeita (Kluge *et al.* 2007; Deisenhammer *et al.* 2015). Como o LCR é oligoproteico em relação ao sangue, para preservar a morfologia das células e facilitar o reconhecimento, o LCR pode ser enriquecido com albumina bovina.

Os dois principais métodos de concentração de células de LCR são a citocentrifugação e a câmara de sedimentação gravitacional. A literatura não fornece consenso sobre a melhor técnica (Whitmore *et al.*, 1982; Bigner *et al.* 1981), uma vez que ambos os métodos apresentam vantagens e desvantagens.

Citocentrifugação

Com o método de citocentrifugação é possível utilizar o LCR puro ou o sedimento obtido após centrifugação. Na Figura 14.4 é mostrada a visão interna de uma citocentrífuga. Para melhorar a adesão das células na lâmina e reduzir a distorção da mesma, pode ser adicionado ao sedimento 50 µl de albumina bovina a 22%. Coloca-se 100 µL da amostra no citofunil de acordo com o manual de instrução da citocentrífuga que será utilizada. O líquido sobrenadante é absorvido pelo papel filtro, concentrando as células presentes na amostra. Após a citocentrifugação, deve-se aguardar a secagem completa da lâmina e, então, realizar a coloração com corantes hematológicos como o May Grünwald-Giemsa.

Método de sedimentação

A confecção da lâmina em câmara de Suta (Figura 14.5) é um processo mais trabalhoso, porém fornece uma lâmina de boa qualidade. Esta câmara de sedimentação possui um sistema de filtros de papel, que absorve a parte líquida do LCR, concentrando as células. A quantidade de líquido a ser colocada na câmara para a confecção da lâmina depende da quantidade de leucócitos presentes na amostra (Tabela 14.6). A lâmina é introduzida na câmara e sobre ela coloca-se um papel absorvente, o qual deve conter um halo de diâmetro discretamente menor que o diâmetro do tubo conector da câmara. O tubo conector deve ser rosqueado na base até tocar na lâmina. Em seguida, coloca-se na câmara o volume de LCR necessário e espera-se a lâmina secar. Somente após a secagem retira-se o tubo

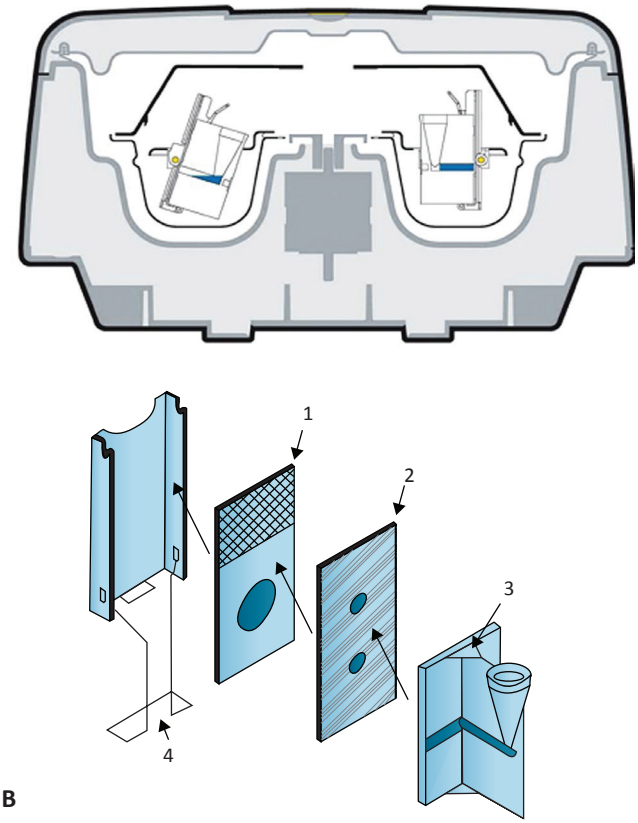


Figura 14.4 Citocentrífuga. **(A)** visão interna de uma citocentrífuga. **(B)** (1) lâmina de vidro; (2) papel de filtro; (3) citofunil; (4) suporte. Após a citocentrifugação as lâminas devem secar naturalmente antes de serem coradas e examinadas microscopicamente.

conector e o papel absorvente de cima da lâmina e realiza-se a coloração com corante hematológico.

Após a confecção e coloração da lâmina, deve-se proceder à contagem diferencial das células em objetiva de imersão (100×). Caso a lâmina esteja com muita sobreposição de células, deve-se confeccionar nova lâmina utilizando uma

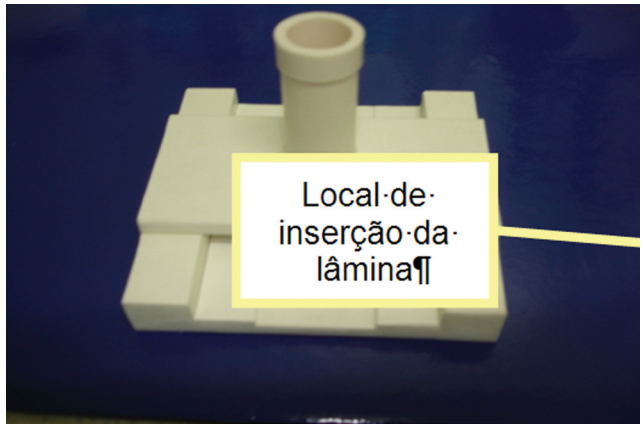


Figura 14.5 Câmara de Suta.

Tabela 14.6 Volume utilizado na câmara de Suta para a confecção da lâmina de contagem diferencial de leucócitos do LCR, de acordo com o resultado da contagem global de leucócitos.

Contagem global (/μL)	Volume a ser utilizado na câmara (mL)
10-50	1,5-2,0
50-100	1,2-1,8
100-200	1,0-1,5
200-500	0,8-1,0
500-1.000	0,5-0,8
> 2.000	0,2-0,3

Fonte: Kjeldsberg; Knight (1993).

diluição apropriada. Após a citocentrifugação pode ocorrer distorção nas células, as quais podem apresentar formação de vacúolos e projeções citoplasmáticas, fendas nucleares, nucléolos proeminentes e agrupamentos celulares semelhantes à neoplasia (Torzewski *et al.*, 2008).

A contagem diferencial de células no LCR por métodos automatizados é ainda de acurácia limitada, apesar do grande desenvolvimento dos citômetros nas últimas décadas. Os citômetros atuais não apresentam sensibilidade e especificidade adequada para uso em amostras de LCR, principalmente com pequeno número de células totais, que representam a maioria.

Células de morfologia normal no LCR

O LCR normal possui 70% de linfócitos e 30% de monócitos. A Figura 14.6 ilustra linfócitos e monócitos normais. Outras células como neutrófilos, plasmócitos, eosinófilos, basófilos e macrófagos não são usualmente encontrados no

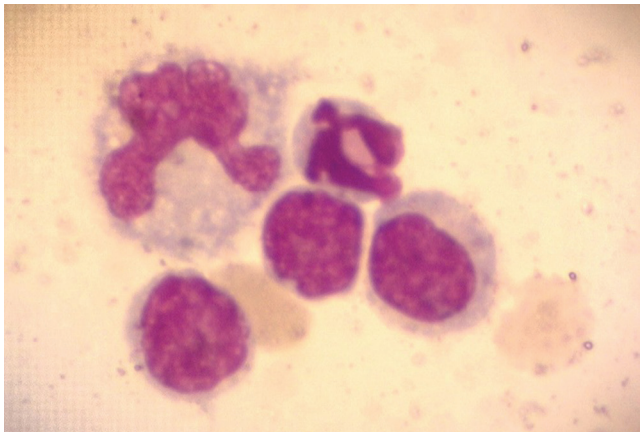


Figura 14.6 Monócitos e linfócitos (Aumento 1.000×). Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

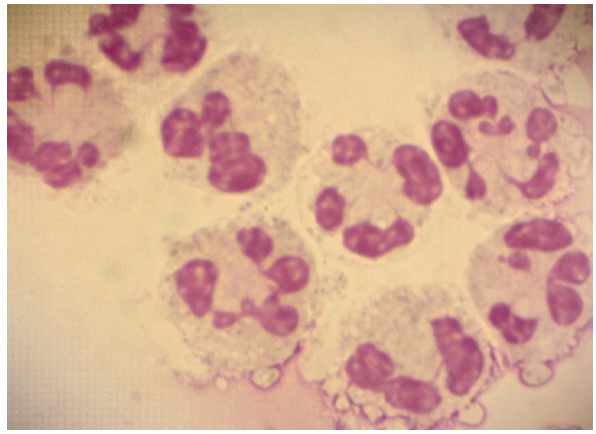


Figura 14.7 Neutrófilos (Aumento 1.000×). Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

LCR normal (Figuras 14.7 a 14.9). Ocasionalmente, eosinófilos ou polimorfonucleares (PMN) únicos podem ser visualizados no LCR normal (Fishman, 1992). O significado clínico das células encontradas no LCR é apresentado na Tabela 14.7.

Eosinófilos são células ausentes no LCR normal. As causas da presença de eosinófilos no LCR podem estar associadas a doenças infecciosas e não infecciosas. Em 20.008 laudos de LCR do laboratório de análises clínicas do HC-UFPR, eosinófilos estavam presentes em 5% dos laudos (Figura 14.10). A meningite eosinofílica é definida como a presença de 10% ou mais de eosinófilos no LCR, e as causas podem ser múltiplas. Atualmente a principal delas é a infecção por *Angiostrongylus cantonensis,* (Tabela 14.8), causador de meningite eosinofílica benigna autolimitada. O diagnóstico etiológico é feito por fortes evidências epidemiológicas e testes imunológicos.

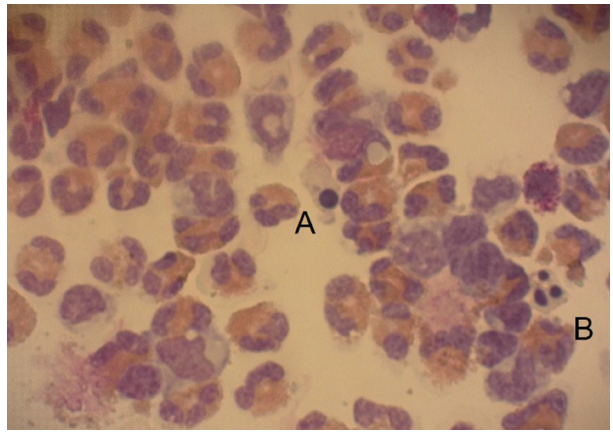


Figura 14.8 Eosinófilos **(A)** Cariopicnose **(B)** Cariorexis (Aumento 400×). Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

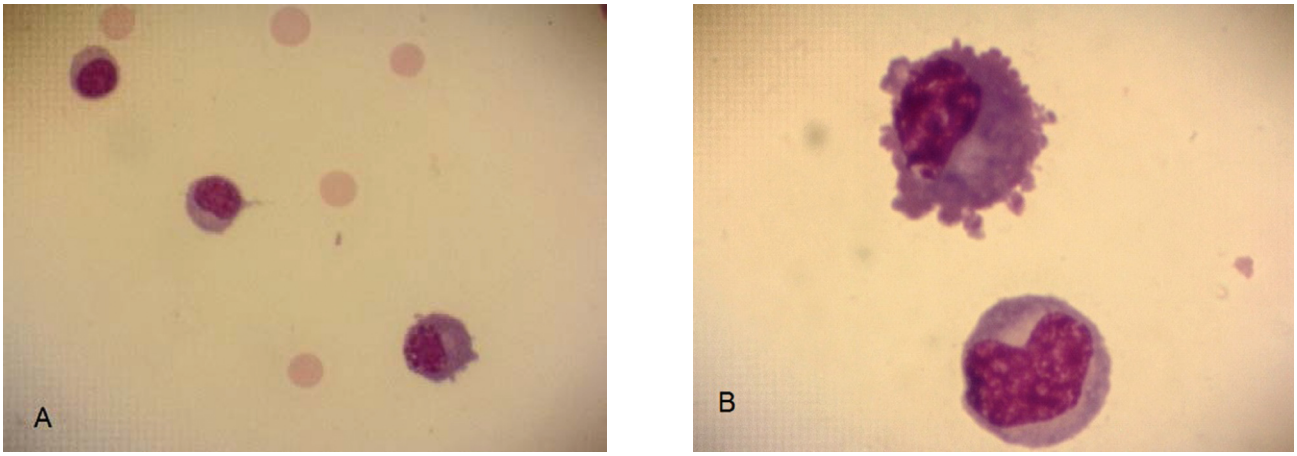


Figura 14.9 Plasmócitos **(A)** Aumento 400× **(B)** Aumento 1.000. Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

Tabela 14.7 Significado clínico das células encontradas na contagem diferencial do LCR.

Predomínio celular	Significado clínico
Linfócitos	Meningite viral, tuberculosa e fúngica. Ocasionalmente em meningite bacteriana. Esclerose múltipla.
Neutrófilos	Meningite bacteriana, fase inicial de meningite viral, tuberculosa e fúngica. Hemorragia subaracnoídea, injeções intratecais, tumores meningeais.
Reação celular mista (linfócitos, neutrófilos e monócitos)	Meningite bacteriana parcialmente tratada, meningite bacteriana crônica, abscesso cerebral, meningite tuberculosa, meningite fúngica e meningite amebiana.
Eosinófilos	Infecções parasitárias, reações alérgicas, derivação ventricular.
Macrófagos	Meningite crônica, meningite bacteriana tratada, injeções intratecais e hemorragia subaracnoídea.
Macrófago eritrófago (contendo hemácias)	Acidente de punção ou hemorragia subaracnoídea (12h a 1 semana).
Macrófago siderófago (contendo hemossiderina)	Hemorragia subaracnoídea (2 dias a 2 meses).
Macrófago hematoidinófago (contendo cristais de hematoidina)	Hemorragia subaracnoídea (2 a 4 semanas).
Macrófago lipófago (contendo gordura)	Necrose cerebral, infarto, anoxia e traumatismo craniano.
Plasmócitos	Reações subagudas e reações inflamatórias crônicas, esclerose múltipla.
Células linfoides malignas	Linfoma, leucemia.
Blastos	Linfoma, leucemia.
Outras células malignas	Tumor cerebral primário, tumor metastático.
Células ependimais e do plexo coroide	Trauma, cirurgia, derivação ventricular, recém-nascidos e injeções intratecais.
Condrócitos	Punção acidental de disco intervertebral (raro).
Células da medula óssea	Punção acidental do corpo vertebral (raro).
Agrupamentos de células imaturas, semelhantes a blastos	Hemorragia subaracnoídea em prematuros e recém-nascidos. Possivelmente originadas da matriz germinal.

Fonte: Modificada de Kjeldsberg; Knight (1993).

Pesquisa de células neoplásicas no LCR

A detecção de células neoplásicas no LCR é fundamental no diagnóstico de tumores cerebrais. Avanços diagnósticos, como a ressonância magnética, ensaios para marcadores tumorais, amplificação do DNA, citometria de fluxo e as técnicas imuno-histoquímicas estão agora disponíveis para facilitar o diagnóstico. Apesar destes avanços, o método padrão ouro para a detecção de células neoplásicas ainda é a pesquisa direta de células no LCR.

A hipótese de envolvimento do SNC por neoplasias deve ser feita em todo paciente com neoplasias conhecidas que apresentam sintomas neurológicos. A pesquisa de células neoplásicas no LCR por microscopia óptica é obrigatória em todos os casos de neoplasia conhecida ou fortemente suspeita e sintomas neurológicos. Isto é particularmente verdadeiro

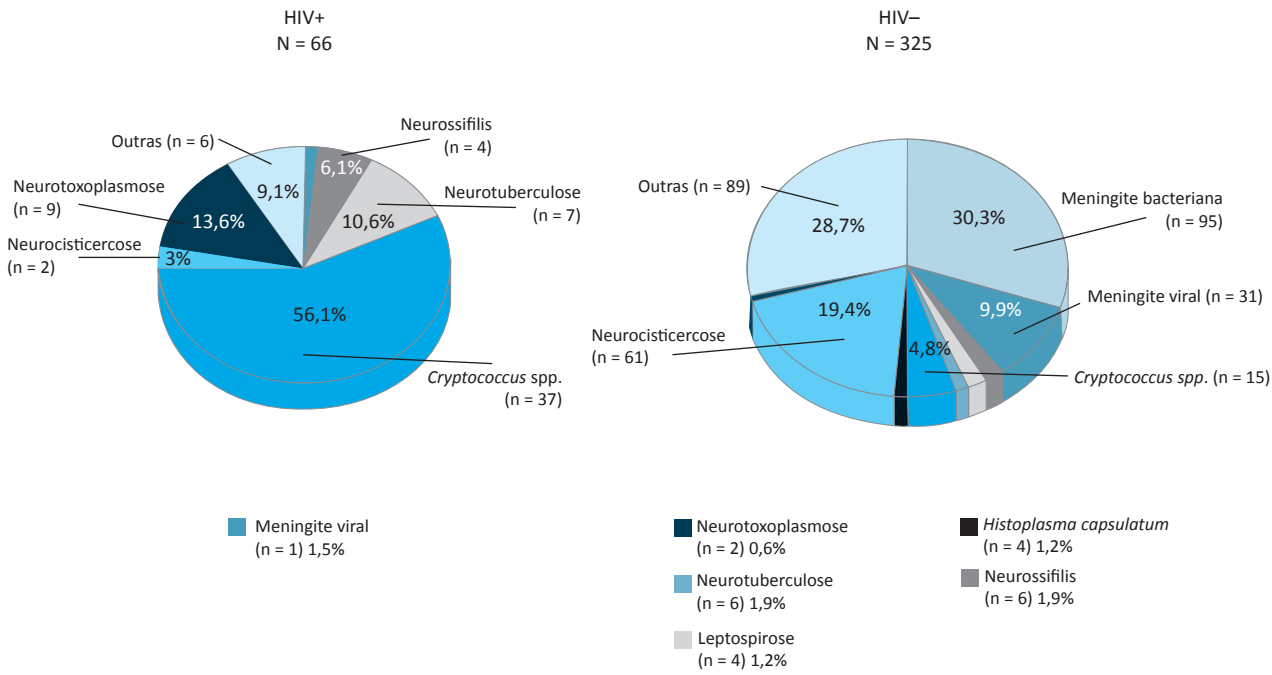


Figura 14.10 Etiologias infecciosas associadas à presença de eosinófilos no LCR, na presença ou ausência de infecção pelo HIV.
Fonte: Almeida *et al.*, 2018 (em publicação).

Tabela 14.8 Taxa de positividade de pesquisa de células neoplásicas em amostras de LCR.

Indicação	N	Positivo	%
LLA	254	63	24,8
LMC	16	02	12,5
LMA	63	13	20,6
Linfoma	43	09	20,9
Retinoblastoma	08	04	50
Outros*	27	07	25,9
Todos	411	98	23,8

* Pulmão, gástrico, mama, melanoma, próstata, sarcoma de Ewing, rabdomiossarcoma, glioblastoma, astrocitoma, Schwanoma, leucemia linfocítica crônica.
Fonte: Almeida *et al.*, 2007.

em casos de leucemia e linfoma, nos quais os resultados da contagem de células de LCR e citologia são fatores importantes na determinação e monitoramento do tratamento (Mackenzie, 1996; Fleming *et al.*, 2015; Broussalis *et al.*, 2012).

As células malignas de uma variedade de tumores, metástases ou primárias, podem ser detectadas no LCR. Qualquer tipo de neoplasia pode se espalhar para leptomeninges (Figuras 14.11 a 14.16). Essa disseminação ocorre com mais frequência em doenças hematológicas agudas, como leucemia e linfomas. Entre os tumores sólidos, a disseminação é mais frequente com melanomas e câncer de mama ou câncer de pulmão. Entre os tumores primários do SNC, as células tumorais são mais comumente encontradas no LCR em gliomas e meduloblastomas, devido à sua maior incidência e tendência a se espalhar para o espaço subaracnoídeo (Tabela 14.8) (Almeida *et al.*, 2007)

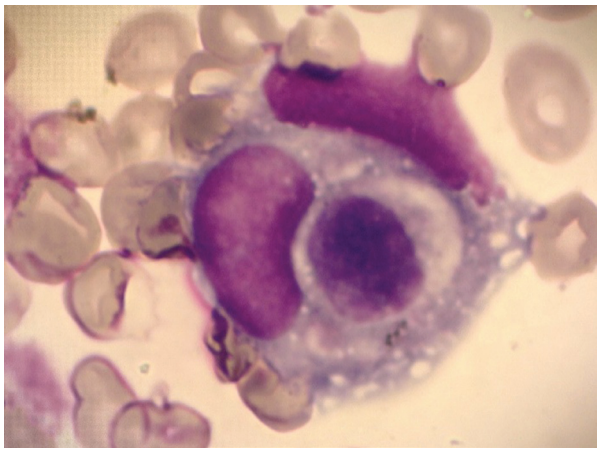


Figura 14.11 Canibalismo celular (Aumento 1.000×). Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

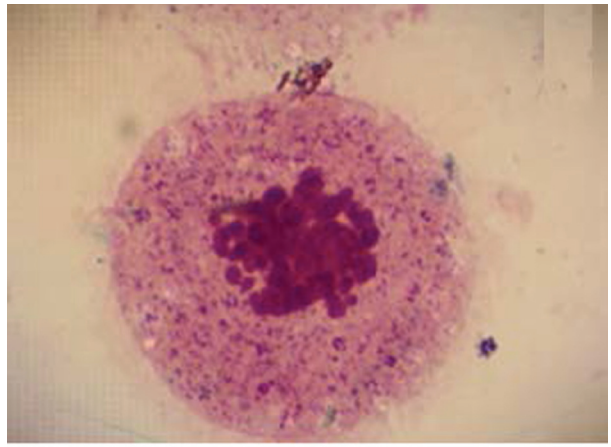
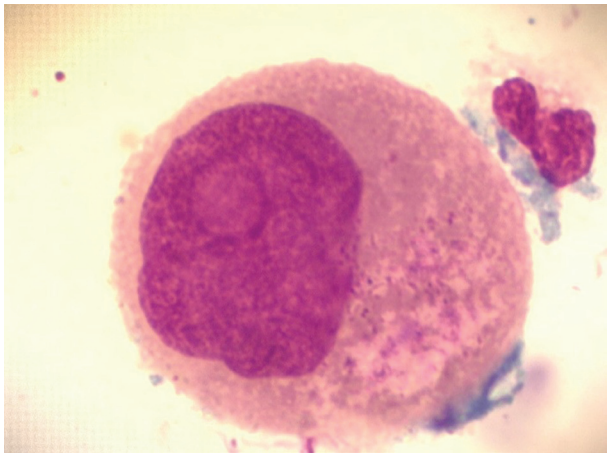
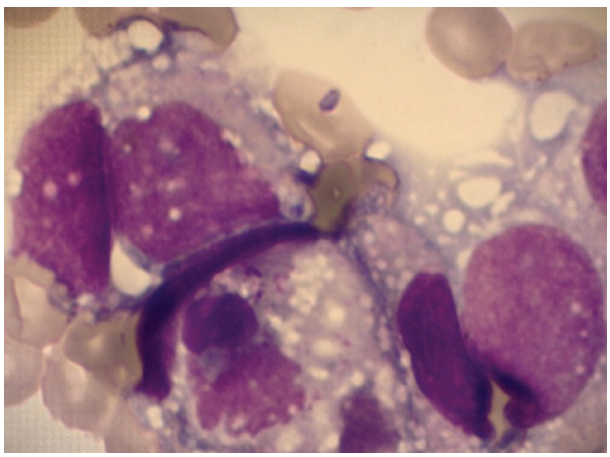


Figura 14.12 Mitose atípica (células malignas) (Aumento 1.000×) Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.





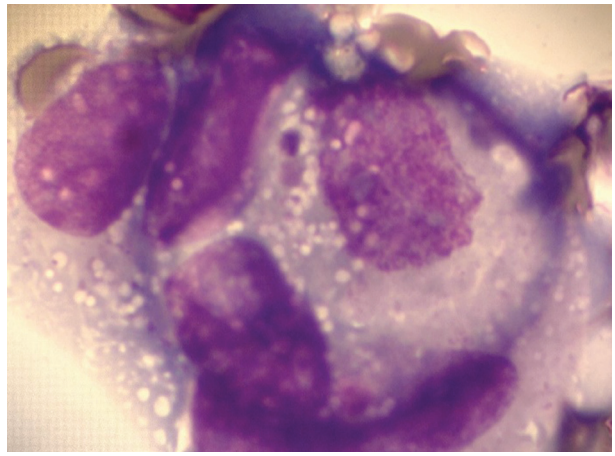


Figura 14.13 A, B, C. Células de infiltração de câncer de mama (Aumento 1.000×). Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

A porcentagem de detecção de células malignas por análise citológica é influenciada por alguns fatores, incluindo o volume de LCR obtido, número de amostras coletadas e o tempo após coleta. Volume insuficiente de amostra é uma possível explicação para análises citológicas falso-negativas. Glantz *et al.* (1998) sugeriram que as taxas de resultados falso-negativos diminuíram de 32% para valores próximos de 3%, quando o volume colhido de amostra aumentou de 2,5 mL

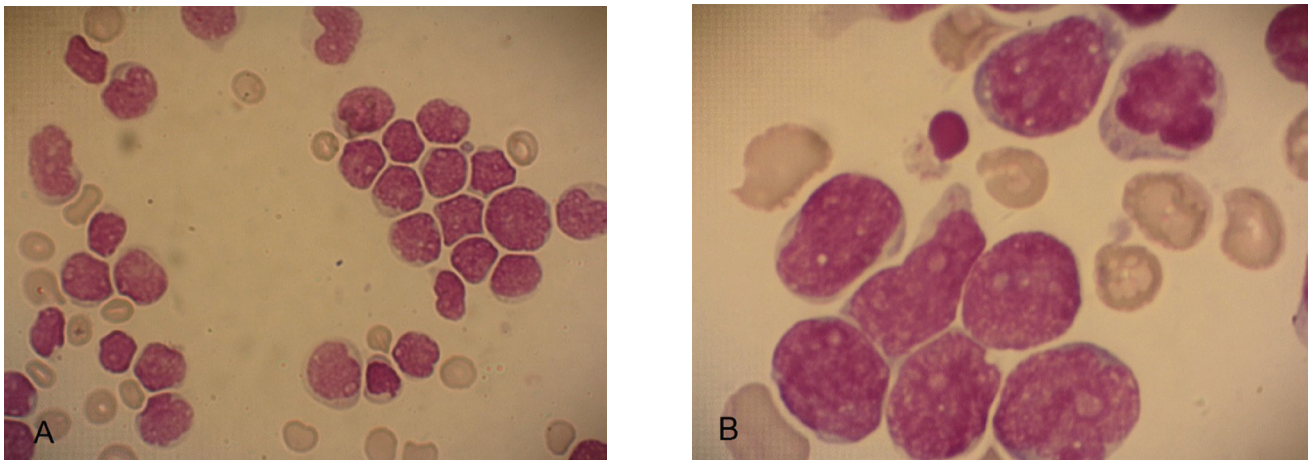


Figura 14.14 Infiltração de Leucemia Linfoide Aguda em SNC **(A)** Aumento 400× **(B)** Aumento 1.000×. Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

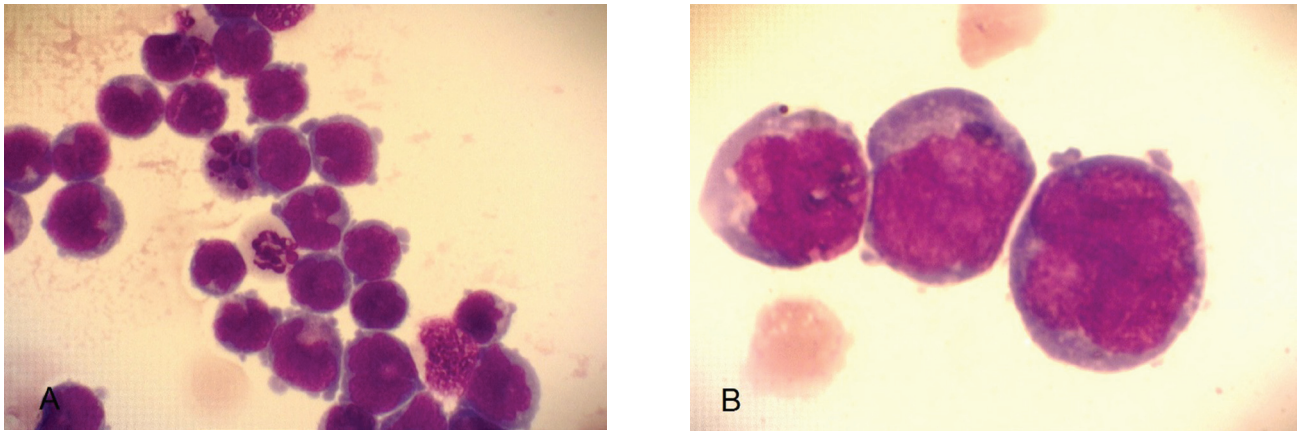


Figura 14.15 Infiltração de Leucemia Mieloide Crônica em crise blástica **(A)** Aumento 400× **(B)** Aumento 1.000×. Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

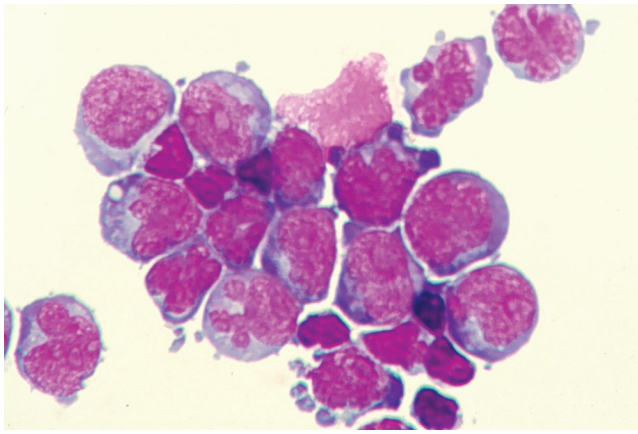


Figura 14.16 Linfoma primário de SNC, *Aumento* 1.000×, Coloração de May Grünwald-Giemsa.
Fonte: Os autores.

para 10,5 mL, respectivamente. Não é definido na literatura se o local de coleta de LCR, lombar ou subocciptal, pode aumentar a positividade da pesquisa de células neoplásicas no LCR ou mesmo a pesquisa de bacilo da tuberculose ou fungos.

Como ocorre a perda de células em função do tempo após a coleta, a refrigeração da amostra, mas não congelamento, é recomendada se houver atraso na análise citológica (Jerrard *et al.*, 2001).

Para verificar a qualidade das lâminas confeccionadas, principalmente em amostras com contagens baixas de leucócitos, deve-se relacionar o número total de leucócitos encontrados na lâmina com a contagem global. A Tabela 14.9 mostra a relação, desenvolvida de forma empírica, entre o número de células encontradas na lâmina e a contagem global de leucócitos.

Tabela 14.9 Relação entre o número de células encontradas na lâmina e a contagem global de leucócitos.

Número de leucócitos/µl contados na câmara	Número de células que devem estar presentes na lâmina após a citocentrifugação
0	0 – 40
1 – 5	20 – 100
6 – 10	60 – 150
11 – 20	150 250
20	250

Fonte: Comar *et al.* (2009).

A citometria de fluxo para identificação de marcadores celulares de superfície pode auxiliar no diagnóstico de infiltrações leucêmicas, linfomas (Figuras 14.17 A, B e C) e outros tumores do SNC, porém não substituem a pesquisa direta de células neoplásicas, mas sim associada a esta. Para o estudo de subpopulações celulares no LCR o método ainda não foi validado. As Figuras 14.17 A, B e C mostram a análise das células do LCR por citometria de fluxo, identificando um linfoma primário de SNC (Figura 14.16), de células B com produção clonal de cadeias leves de IgG Kappa.

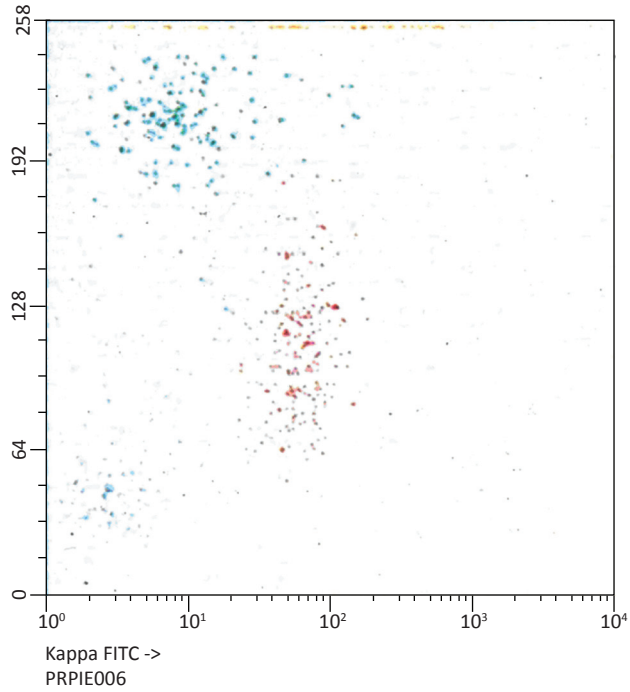


Figura 14.17 B. Linfoma de células B primário de SNC, clonal para cadeia leve IgG Kappa, pontos em vermelho.
Fonte: Os autores.

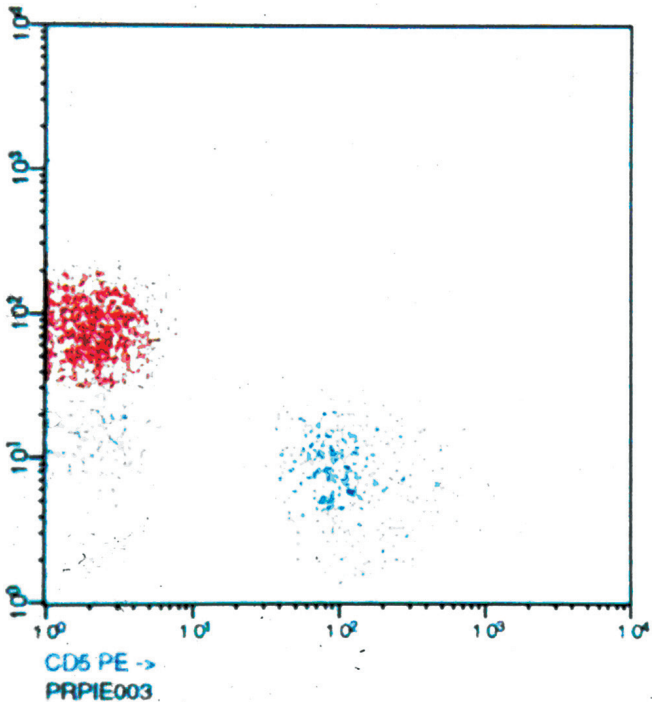


Figura 14.17 A. Citometria de fluxo, linfoma primário de SNC de células B (CD19), pontos em vermelho.
Fonte: Os autores.

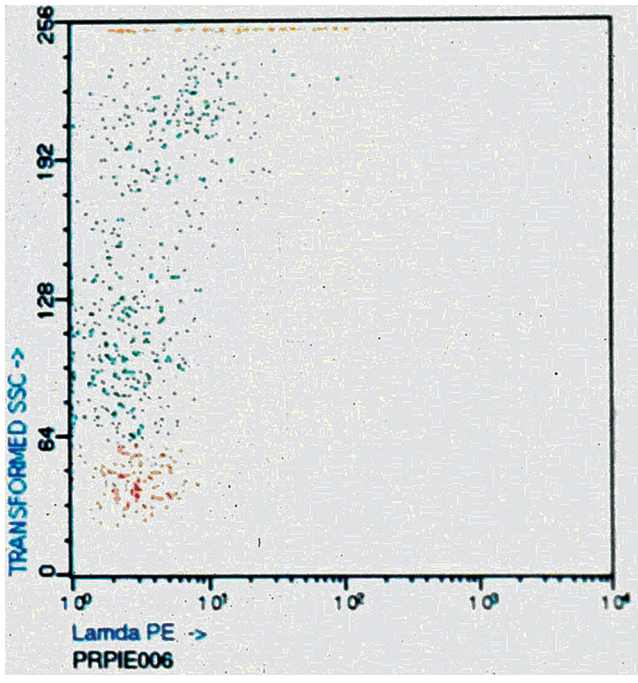


Figura 14.17 C. Linfoma de células B primário de SNC, análise com anticorpo monoclonal para IgG lambda.
Fonte: Os autores.

Proteínas totais no LCR

A maior parte das proteínas encontradas no LCR é proveniente do plasma e uma pequena proporção é produzida no SNC. Os valores de referência de proteínas totais varia de acordo com o local de coleta. Nos adultos, o valor de referência do LCR lombar está entre 15 e 45 mg/dL e em adultos acima de 60 anos os valores estão entre 30 e 60 mg/dL. Os valores de referência para LCR cisternal ou suboccipital variam de 15 a 25 mg/dL e ventricular de 5 a 15 mg/dL (Fishman, 1992).

O aumento das proteínas totais no LCR está relacionado com a disfunção da barreira hematoliquórica ou síntese intratecal de imunoglobulinas (Strasinger; Lorenzo, 2009).

A ocorrência de acentuada elevação das proteínas, sem aumento correspondente nas células do LCR, é conhecida como dissociação albuminocitológica. Essa dissociação encontra-se relacionada à Síndrome de Guillain-Barré ou polineurite idiopática aguda (Ravel, 1997).

Valores anormalmente baixos de proteínas são pouco frequentes e estão relacionados com a fístula liquórica, causando perda de LCR (rinorreia ou otorreia), pseudotumor cerebral, hipertireoidismo (Fishman, 1992).

A determinação da proteína total no LCR apresenta diversas dificuldades como baixa concentração, presença de diferentes tipos de proteínas, pequena quantidade de fluido disponível para a análise, especialmente em amostras pediátricas, e as variações na metodologia (Kjeldsberg; Knight, 1993).

A determinação quantitativa das proteínas totais do LCR pode ser efetuada por meio de vários métodos: turbidimétricos (tricloro-acético, sulfossalicílico) não automatizados; métodos colorimétricos com vermelho de Pyrogalol, cloreto de Benzetônio (Architect-Abbott, IL).

Os métodos utilizados para quantificar proteínas totais no LCR são métodos turbidimétricos ou colorimétricos. Nos métodos turbidimétricos os agentes precipitantes são o Ácido Tricloroacético ou Ácido Sulfossalicílico. Essas técnicas são rápidas, fáceis, porém não automatizadas, mas não necessitam de equipamentos sofisticados. O inconveniente desse método é que a albumina produz uma turbidez quatro vezes maior quando comparada às globulinas. Quando o ácido sulfossalicílico é combinado com o sulfato de sódio, as reações com albumina e globulinas são mais similares. Outro método turbidimétrico é aquele que utiliza o cloreto de benzetônio, e é automatizado. Nessa técnica a amostra é pré-incubada em solução alcalina que desnatura as proteínas. Após isso, adiciona-se o cloreto de benzetônio, produzindo uma turbidez que é lida a 512 nm. (Kjeldsberg, Knight,1993; Burtis, Bruns, 2016).

O método colorimétrico utilizado no LCR é o Vermelho de Pirogalol, é automatizado e consiste na reação das proteínas com o Vermelho de Pirogalol e o molibdato em meio ácido, formando um complexo colorido cuja absorbância é medida em 600 nm. Esse método é sensível para ser utilizado em líquidos cefalorraquidianos que possuem concentrações de proteínas demasiadamente baixas (Burtis; Bruns, 2016).

Outros métodos aplicáveis em soro como Biureto ou Lowry, e Bradford não são aplicáveis ao LCR, pois são pouco sensíveis devido à baixa concentração de proteínas, suscetível a muitos interferentes (Kjeldsberg, Knight, 1993; Zaia *et al.,*1998).

A Reação de Pandy é um método semiquantitativo de globulinas, pouco específico. Consiste na adição de uma gota de LCR em 1 mL de solução de Pandy (ácido fênico a 0,66%). Este reagente reage com todas as proteínas, mas exibe reação aparentemente maior com as globulinas. A aparência turva significa a presença de níveis elevados de globulinas no LCR e é considerada uma reação positiva de Pandy. A contaminação pelo sangue quase sempre produz resultados falso-positivos (Ravel, 1997; Leite *et al.*, 2016).

Análises bioquímicas

Vale a pena ressaltar que a quantificação de cloretos no LCR, apesar de realizada por vários laboratórios no Brasil, não apresenta valor clínico, por refletir exatamente as alterações no sangue. Isso está comprovado desde a década de 1930 do século XX. As causas de alteração de cloretos no sangue periférico são múltiplas, não sendo, portanto, necessária sua quantificação (Fishman, 1992).

Albumina

A albumina é sintetizada no fígado, portanto, toda a albumina presente no LCR tem origem no plasma. O método padrão ouro de quantificação de albumina no LCR é a nefelometria (Reiber *et al.*, 2003), porém, outros métodos como turbidimetria são utilizados. Os valores de referência da concentração de albumina no LCR oscilam entre 10 e 30 mg/dl. O quociente de concentração da albumina no LCR em relação à albumina no plasma pode ser utilizado para avaliar a integridade da barreira hematoencefálica. Em adultos, em condições normais, o quociente deve ser inferior a 9; valores entre 9 e 30 indicam alterações moderadas na barreira hematoencefálica, entre 30 e 100 alterações severas e superior a 100 indica perda da integridade funcional da barreira. Em recém-nascidos, os valores do quociente podem ser superiores aos do adulto devido à imaturidade da barreira hematoencefálica. O quociente de concentração de albumina é influenciado pelo peso corporal, sexo, hipotireoidismo, consumo de álcool e cigarro (Kjeldsberg; Knight, 1993; BRÚ; Alabern, 2002; Gilhus *et al.*, 2011).

$$\text{Quociente de Albumina} = \frac{\text{Albumina no LCR (mg/dL)}}{\text{Albumina sérica (g/dL)}}$$

O limite superior de intervalo de referência para cada indivíduo varia com a idade e pode ser calculado de acordo com a fórmula: 4+ idade em anos/15 (Reiber; Peter, 2001).

Imunoglobulinas no LCR

Em condições normais, as imunoglobulinas do LCR são principalmente de origem plasmática, sendo sua síntese intratecal muito baixa. O método padrão ouro de quantificação de

imunoglobulinas no LCR é a nefelometria (Reiber *et al.*, 2003), porém, outros métodos como turbidimetria são utilizados.

A síntese intratecal de imunoglobulinas pode estar relacionada a doenças infecciosas ou inflamatórias agudas ou crônicas (Brú, Alabern, 2002).

Uma variedade de fórmulas foi proposta para quantificar a proporção de imunoglobulinas no LCR sintetizadas no SNC. Estas fórmulas, em princípio, procuram corrigir os níveis de imunoglobulinas derivadas do sangue que passariam para o LCR através da barreira hematoencefálica alterada.

O cálculo do índice de IgG é utilizado para identificar síntese intratecal de IgG. O índice de IgG é a relação entre o quociente de concentração de IgG pelo quociente de concentração de albumina (Gilhus *et al.*, 2011; Marshall *et al.*, 2016).

$$\text{Índice de IgG} = \frac{\text{IgG no LCR (mg/dL)/IgG no soro (g/dL)}}{\text{Albumina no LCR (mg/dL)/Albumina no soro (g/dL)}}$$

O intervalo de referência para o índice de IgG se situa entre 0,30 e 0,70; valores superiores a 0,70 indicam aumento da produção intratecal de imunoglobulinas. Em aproximadamente 90% dos pacientes com esclerose múltipla definitiva, o índice é maior que 0,70 (Brú; Alabern, 2002).

A maioria das fórmulas considera a passagem de albumina e imunoglobulina pela barreira hematoencefálica de forma linear; porém outras análises, como a função hiperbólica de IgG (Figura 14.18), apresentam a vantagem de não serem relações lineares (Reiber, 1994). Este gráfico pode ser utilizado, com adaptações, para IgA e IgM.

Eletroforese

Eletroforese em acetato de celulose ou agarose

A eletroforese de proteínas revela a presença de diferentes espectros de proteínas no líquido cefalorraquidiano. Na Tabela 14.10 é apresentado o padrão normal das frações proteicas encontradas no LCR por eletroforese. (Chaves *et al.*,2008; Herndon; Brumback, 2012).

Tabela 14.10 Eletroforese das frações proteicas no LCR.

Proteínas totais	39,5 ± 4,8 mg/dL
Pré-albumina	3,9 ± 0,8%
Albumina	46,4± 3,6%
α-1	6,3 ± 2,8%
α-2	10,5 ± 2,6%
β	18,6 ± 3,7%
γ	12,6 ± 3,7%

Fonte: Herndon; Brumback (2012).

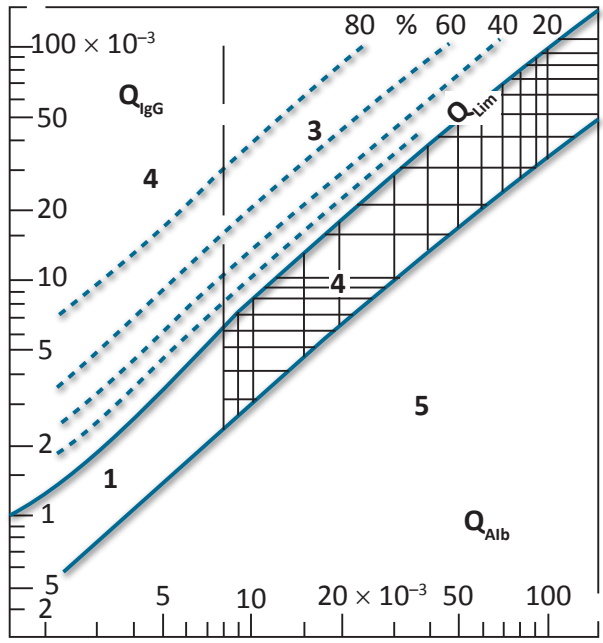


Figura 14.18 Função hiperbólica de IgG (Reibergram): diagrama de quociente LCR/soro para IgG e Albumina.
1. Normal; 2. Alteração da função da barreira hematoliquórica; 3. síntese intratecal de IgG + alteração da função da barreira hematoliquórica; 4. síntese intratecal; 5. problema nas quantificações.
Fonte: Reiber *et al.*, 1994.

Com métodos eletroforéticos é possível classificar a resposta humoral de acordo com o número de anticorpos produzidos. Esses métodos têm sido substituídos por técnicas mais sensíveis, como a focalização isoelétrica e imunofixação (Marshall *et al.*, 2016).

A distribuição de imunoglobulinas anormais pode ser monoclonal, policlonal e oligoclonal. Na monoclonal ocorre a identificação de apenas um lote de proteínas secretadas por um clone de plasmócitos, na focalização isoelétrica, apenas uma banda é registrada. A policlonal identifica centenas de bandas distribuídas em uma curva, e essa anormalidade pode ser confundida com artefatos. Na anormalidade oligoclonal, geralmente de duas a cinco bandas são vistas na região gama decorrentes da proliferação de poucos clones de plasmócitos (Chaves *et al.*, 2008).

Pesquisa de bandas oligoclonais

A detecção de bandas oligoclonais IgG no LCR é um dos critérios para diagnóstico da Esclerose Múltipla, uma doença inflamatória crônica, desmielinizante e degenerativa do sistema nervoso central (Gama *et al.*, 2009; Marshall *et al.*, 2016).

De acordo com consenso internacional, recomenda-se a detecção de bandas oligoclonais de IgG por focalização isoelétrica, com posterior imunodetecção por immunofixação

(Reiber, 2004). Devido a sua alta sensibilidade e reprodutibilidade a focalização isoelétrica é a técnica preferida para detectar as bandas oligoclonais.

As amostras de LCR e soro sempre devem ser analisadas simultaneamente. É importante realizar a pesquisa de bandas oligoclonais paralelamente no LCR e no soro (Andersson *et al.*, 1994).

Os padrões de bandas encontradas na focalização isoelétrica no LCR e no soro são: (Tipo 1) normal; (Tipo 2) bandas oligoclonais restritas à síntese intratecal encontrada na esclerose múltipla; (Tipo 3) bandas oligoclonais restritas no LCR e não presentes no soro, com adição de bandas IgG idênticas no LCR e no soro encontradas na esclerose múltipla e em inflamações no SNC causadas por doenças sistêmicas como a sarcoidose; (Tipo 4) bandas oligoclonais idênticas no soro e no LCR, encontradas na Síndrome de Guillain-Barré; (Tipo 5) bandas monoclonais no LCR e no soro encontradas no mieloma ou gamopatia monoclonal de significado incerto. Somente os padrões do Tipo 2 e Tipo 3 representam a síntese intratecal de IgG dentro do SNC (Andersson *et al.*, 1994).

A sensibilidade da focalização isoelétrica para a detecção de bandas oligoclonais na esclerose múltipla definida é maior que 95% (Awad *et al.*, 2010). Porém, a presença de bandas oligoclonais no LCR não são específicas para esclerose múltipla, e podem ser encontradas em várias doenças como a neurosarcoidose, lúpus eritematoso sistêmico, panencefalite esclerosante subaguda, neurosífilis, HIV, encefalite, neoplasias e paraneoplasias (Awad *et al.*, 2010).

Na Figura 14.19 é apresentada uma análise de bandas oligoclonais de IgG, por focalização isoelétrica e imunofixação para IgG, em pacientes com HIV, em várias coletas sequenciais.

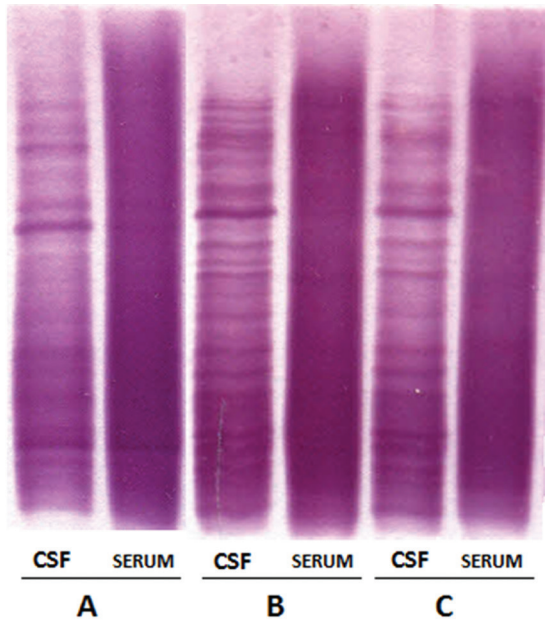


Figura 14.19 Análise qualitativa sequencial de síntese intratecal de IgG em pacientes com HIV.
Presença de bandas oligoclonais por focalização isoelétrica em gel de agarose (Hydragel CSF Isofocusing - Sebia, Norcross, GA). Bandas oligoclonais tipo 3 (Andersson et al., 1994). Bandas de IgG no LCR e soro, com bandas adicionais no LCR que não estão presentes no soro. Amostras **(A)** coletadas em tempos diferentes após a identificação do HIV RNA no LCR e no sangue. Amostra **(B)** 2,5 meses depois da mudança dos ARV. Amostra **(C)** 18 meses depois da mudança do esquema ARV. O padrão de bandas oligoclonais no LCR era similar nas três amostras, indicando um persistente estímulo imunológico.
ARV: antirretrovirais
Fonte: De Almeida *et al.* (2017).

Glicose no LCR

Os métodos enzimáticos colorimétricos são usualmente utilizados para dosar glicose no LCR e no sangue. Os valores de referência de glicose no LCR são 45 a 80 mg/dL (Kjelds-

Tabela 14.11 Valores de referência e diagnóstico diferencial das meningites agudas e crônicas através do LCR.

	Normal	Aguda		Crônica	
		Bacteria	Viral	Tb	Fungo
Pressão mm/H_2O	100-200	N/↑	N/↑	N/↑	N/↑↑
Aspecto	Claro	Turvo/purulento	Claro/turvo	Claro/turvo	Claro/turvo
Cor	Incolor	branco	Incolor	Xantocromico	Branco
Células/mm³	3-5	> 1.000 neutrófilos	> 500 linfócitos	< 500 linfócitos	< 500 linfócitos
Proteínas mg/dL	L-45	↑↑	N/↑	↑	N/↑
Glicose mg/dL	50-60	↓	N	↓↓	↓
Lactato mmol/L	< 3,5	> 3,5	< 3,5	> 3,5	> 3,5

Fonte: Almeida *et al*, 2007.

berg; Knight, 1993). A concentração normal da glicose no LCR corresponde a dois terços da glicose plasmática. Como a glicose é transportada ativamente por difusão simples através da barreira hematoencefálica, os níveis de glicose no LCR são diretamente proporcionais aos níveis plasmáticos, e a análise simultânea dos níveis da glicose no LCR e no soro se faz necessária. A relação de glicose do LCR/soro menor que 0,6 é considerada alterada (Dimas; Sohler, 2008; Gilhus *et al.*, 2011; Mundt; Shanahan, 2012).

O LCR leva cerca de 2 a 4 horas para equilibrar a alteração de glicose do sangue. Portanto, a glicemia deveria ser coletada cerca de duas horas antes da punção lombar para que haja tempo de ocorrer o equilíbrio entre o sangue e o LCR. Porém, isso nem sempre é possível nas salas de emergência. Nesses casos, a coleta de amostra de sangue para glicemia pode ser realizada concomitante à punção liquórica. As amostras devem ser testadas imediatamente após a punção lombar porque a glicólise ocorre rapidamente no LCR (Venkatesh *et al.*, 2000; Strasinger; Lorenzo, 2009).

A hipoglicorraquia, com níveis de glicose < 45 mg/dL ou relação glicose LCR/glicose soro < 0,6, geralmente ocorre em situações de hipoglicemia ou no caso de aumento do consumo de glicose pelo SNC, como nas meningites agudas bacterianas. As meningites crônicas, principalmente meningites por tuberculose ou fúngicas, apresentam diminuição de glicose no LCR (Tabela 14.11) (Venkatesh *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2007).

Os níveis de glicose no LCR são parâmetros importantes para o diagnóstico diferencial das meningites agudas bacteriana da viral. Na meningite bacteriana a glicose está usualmente diminuída e na viral os níveis de glicose estão dentro dos valores de referência. Os níveis de glicose retornam ao normal dentro de 36 a 48 horas após o início da terapia antibacteriana efetiva (Venkatesh *et al.*, 2000).

A hiperglicorraquia não tem significado clínico e é relatada quando a concentração de glicose no sangue também está aumentada, como em pacientes diabéticos (Gilhus *et al.*, 2011).

Lactato no LCR

Os valores normais de lactato no LCR estão entre 10 e 20 mg/dL (1,1 a 2,2 mmol/L). Os níveis de lactato no LCR, diferente dos níveis de glicose, não são dependentes da concentração sanguínea, há produção intratecal de lactato.

A determinação dos níveis de lactato é utilizada na diferenciação de meningites agudas, bacterianas e virais (Figura 14.20). O ponto de corte é 3,5 mmol/L, aumentado nas meningites bacterianas e entre os valores normais nas meningites e encefalites virais. O aumento do lactato está intimamente relacionado a baixos níveis de glicose (Dimas; Sohler, 2008;

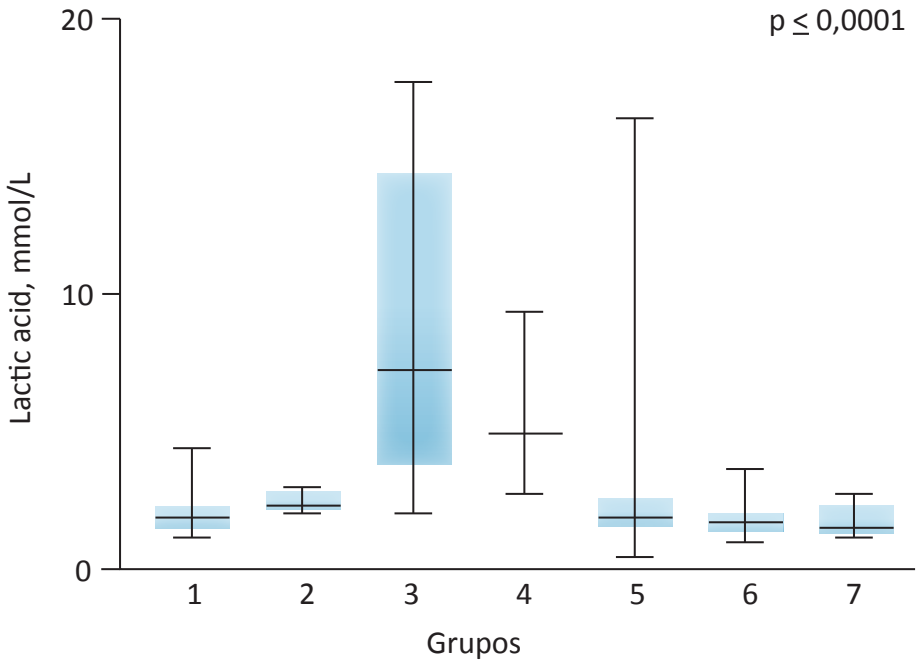


Figura 14.20 Concentração de lactato (mmol/L) em diferentes grupos.
1. Meningite viral; 2. LCR sugestivo de meningite viral, porém, com predomínio de neutrófilos; 3. Meningite bacteriana aguda; 4. Meningite crônica; 5. Doenças neurológicas crônicas não infecciosas; 6. LCR com características citológicas e bioquímicas normais; 7. LCR normal, porém, com presença de hemácias. A quantificação de lactato no LCR foi eficaz no diagnóstico diferencial das meningites virais e bacterianas (grupos 1, 2 e 3), mesmo nos casos sugestivos de meningite viral com predomínio de neutrófilos no LCR (grupo 2). A presença de hemácias no LCR não cursou com aumento dos níveis de lactato e este não foi diferente do grupo controle normal (grupos 6 e 7).
Fonte: Almeida *et al*, 2009.

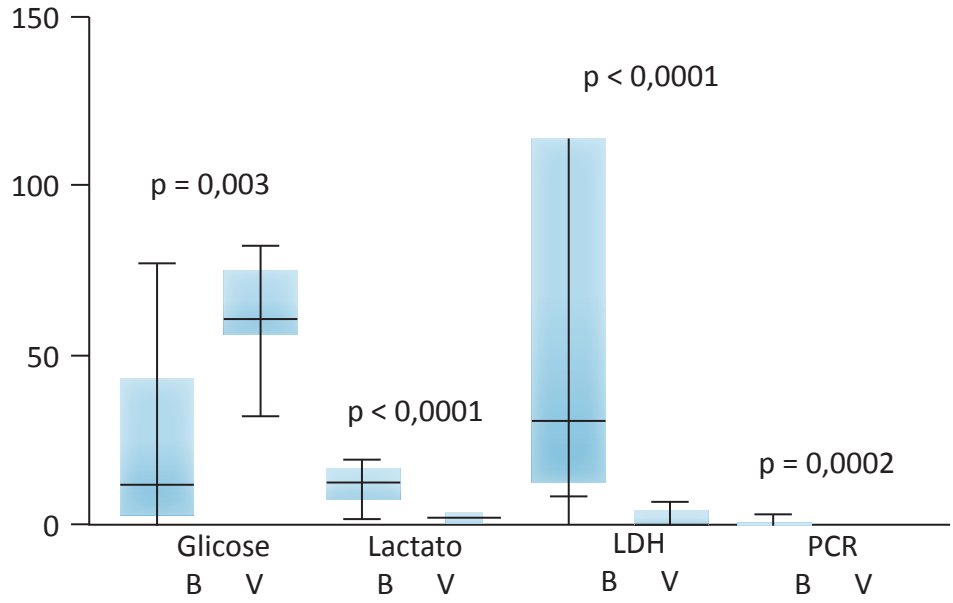


Figura 14.21 Biomarcadores no LCR para diagnóstico diferencial entre as meningites agudas bacteriana **(B)** e viral (V), glicose (mg/dL), lactato (mmol/L), lactato desidrogenase (LDH, U/L) e proteína C reativa (PCR, mg/dL).
Fonte: Almeida *et al.*, 2011.

Almeida *et al.*, 2009). Diferente da glicose, os níveis de lactato no LCR independem dos níveis sérios.

A concentração do lactato encontra-se aumentada nas meningites crônicas fúngicas e por *Micobacterium tuberculosis*. O aumento do lactato nas meningites agudas está intimamente associado a baixos níveis de glicose (Dimas; Sohler, 2008; Almeida *et al.*, 2009).

Outros biomarcadores bioquímicos quantificados no LCR, e que podem auxiliar no diagnóstico diferencial entre as meningites agudas, estão indicados na Figura 14.21 (Almeida *et al.*, 2011). A quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) pode ser utilizada, também, para diferenciar a hemorragia intracraniana da punção traumática, pois nas hemorragias o LDH tem seus níveis aumentados e na punção traumática não ocorre um aumento significativo do LDH (Gnutzmann *et al.*, 2016).

Glutamina no LCR

A glutamina é um aminoácido produzido no SNC a partir da amônia e do α-cetoglutarato. Os valores normais de glutamina no LCR estão entre 8 e 18 mg/dL. A amônia é produzida no intestino e transportada até o fígado onde é metabolizada no ciclo da ureia. Em pacientes com insuficiência hepática ou *shunts* portossistêmicos, a formação da ureia está prejudicada, aumentando os níveis de amônia plasmática. A amônia atravessa a barreira hematoencefálica, é metabolizada nos astrócitos e produz a glutamina. O aumento na produção de glutamina pode indicar uma elevação dos níveis de amônia. A determinação da glutamina é um método indireto para detectar um excesso de amônia no LCR (Mesejo *et al.*, 2008; Strasinger; Lorenzo, 2009). Níveis elevados de glutamina são vistos na encefalopatia hepática. A determinação da glutamina tem utilidade clínica para detectar a presença de amônia, principalmente em pacientes em coma (Melo *et al.*, 2003; Strasinger; Lorenzo, 2009).

Adenosina deaminase no LCR

A adenosina deaminase (ADA) é uma enzima que participa no metabolismo das purinas, onde degrada a adenosina produzindo a inosina e a amônia. A adenosina deaminase é encontrada principalmente nos linfócitos T e está diretamente relacionada com a ativação dessas células (Miranda *et al.*, 2008; Feres *et al.*, 2008).

Níveis aumentados de ADA têm sido observados em condições que envolvem a proliferação dos linfócitos T, como nas meningites tuberculosas, febre tifoide e mononucleose. A importância da dosagem de ADA em líquidos orgânicos já está bem estabelecida, mas ainda existe dificuldade na utilização da ADA como método diagnóstico, pois existe uma variação muito grande nos níveis de normalidade (VR:4 a 9 U/L). No LCR, o valor de corte preconizado pela literatura é de 9 U/L para o diagnóstico de meningite tuberculosa. A ADA demonstra ser um parâmetro muito importante para o diagnóstico de meningite tuberculosa, apesar de não ser patognomônico da doença (Miranda *et al.*, 2008; Feres *et al.*, 2008).

Marcadores de lesão neuronal

Biomarcadores que fazem parte da cadeia de metabolismo amiloide, como β-amiloide 42, proteína Tau e Tau fosforilada (Tabela 14.12), são utilizados principalmente no auxílio do diagnóstico de Doença de Alzheimer (DA). Os perfis destes marcadores no LCR na DA são: diminuição de β-amiloide 42 e aumento de proteína Tau e, principalmente, da Tau fosforilada. Relações e índices entre esses marcadores são descritos para aumentar sua sensibilidade (McKhann *et al.*, 2011). Outros marcadores, com neurofilamentos de cadeia leve, têm sido descritos como possíveis marcadores na DA.

Outros biomarcadores

Diversos biomarcadores no LCR têm sido descritos para auxiliar no diagnóstico de uma série de condições neurológicas (Tabela 14.12).

Alguns biomarcadores são promissores para diagnóstico de doenças neurológicas, como neurofilamentos de cadeia leve, quimiocinas, β2-microglobulina, e neopterina (Blennow, 2017; Brinkmalm, 2017).

A análise proteômica do LCR vem se destacando, e consiste no estudo da expressão, localização e estrutura das proteínas ali presentes através de técnicas atuais de separação

Tabela 14.12 Biomarcadores no LCR, suas características e finalidade.

Biomarcador	Características	Finalidade
CD40 solúvel ligante (sCD40L ou *soluble CD40 ligand*)	Citocina pró-inflamatória	Marcadores inflamatórios
Cistatina C (*gamma-trace cystatin*)	Proteína sintetizada por todas as células nucleadas, inclusive os neurônios. A cistatina se liga à proteína β-amiloide inibindo sua agregação e depósito nos neurônios	Marcador de neuroproteção
Interleucinas	Citocinas envolvidas na regulação da resposta imune e nas reações inflamatórias	Marcadores inflamatórios
Peptídeos β-amiloides (Aβ ou *Amyloid β peptides*; Aβ42)	Peptídeos derivados da clivagem da proteína precursora amiloide (APP), e principais componentes das placas amiloides neuríticas	Marcador de neurodegeneração
Prostaglandina D2 sintetase ou β-trace proteína (L-PGDS ou *lipocalin-type prostaglandin D2 synthase*)	Proteína secretada pelas células do plexo coroide, envolvida no metabolismo da proteína β-amiloide	Marcador de neuroproteção/ Marcador de fístula liquórica (rinorreia)
Proteína básica da mielina (MBP ou *myelin b*)	Proteína presente na bainha de mielina dos neurônios	Marcador de lesão neuronal (dano na mielinização)
Proteína quimioatraente para monócitos 1 (MCP-1 ou *Monocyte c hemoattractant protein-1*)	Citocina pró-inflamatória	Marcadores inflamatórios
Proteína S100 (*S100 calcium binding protein* β)	Proteína estrutural do SNC, produzida e secretada por células da glia (especialmente astrócitos)	Marcador de lesão neuronal
Proteína TAU (Tau total ou T-tau e Tau fosforilada na treonina 181 ou P-tau)	Responsável por estabilizar o citoesqueleto neuronal. Quando está na forma hiperfosforilada, a proteína TAU perde sua função permitindo a formação de emaranhados neurofibrilares	Marcador de lesão neuronal
Sulfatídeos	Principal glicoesfingolipídio da mielina humana	Marcador de lesão neuronal
Glutamina		
Transtiretina (TTR ou *transthyretin*)	Proteína secretada pelo plexo coroide, envolvida no transporte da proteína β-amiloide	Marcador de neuroproteção

Fonte: (Pfanner, 2017; Mantur, 2011; Brinkmalm, 2017; Hajduková, 2015).

e identificação, como a eletroforese bidimensional associada a cromatografia, espectrometria de massa e bioinformática (BRINKMALM, 2017).

LCR DE RECÉM-NASCIDOS

O LCR em recém-nascidos (até os 28 dias) e prematuros apresenta características físicas, celulares e bioquímicas diferentes de crianças nascidas a termo e dos adultos. Os valores de proteínas totais: 15 a 100 mg/dL; leucócitos: 0 a 30 /μL; citologia diferencial: linfócitos: 20% ± 15%, monócitos: 70% ± 20% e neutrófilos: 4% ± 4%. Essas características se alteram à medida que o encéfalo e a barreira hematoencefálica se desenvolvem (Reis *et al.*, 1980; Fishman, 1992). A dificuldade em se estabelecer valores normais de LCR nesta faixa etária se deve ao fato de não se puncionar RN ou prematuros normais.

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

As infecções do SNC possuem alta morbidade e mortalidade, o que requer diagnóstico e intervenção rápidos. Os processos infecciosos podem acometer pacientes imunologicamente hígidos ou imunocomprometidos, que incluem meningites, encefalites, cistos e abscessos cerebrais. Podem ter evolução aguda ou crônica e etiologia bacteriana, viral, fúngica, parasitária ou priônica, como a doença de Creutzfeldt-Jakob. As infecções bacterianas e virais são as mais comuns (Deigendesch, 2017; Thompon, Thakur, 2017). Os principais agentes causadores de infecção do SNC estão descritos na Tabela 14.13, e os agentes etiológicos comuns em nosso meio estão indicados em negrito.

A análise microbiológica do LCR é importante principalmente no diagnóstico etiológico das infecções do SNC, mas vários métodos estão disponíveis com eficácia diferente, dependendo do agente etiológico. A amostra de LCR deve sempre ser coletada em tubos estéreis (Anvisa, 2004).

A amostra encaminhada para as análises microbiológicas deve ser mantida em temperatura ambiente após a coleta e o envio ao laboratório, e processamento deve ser o mais rápido possível; não deve ser resfriada ou congelada, pois a diminuição da temperatura reduz muito a positividade da cultura,

Tabela 14.13 Agentes infecciosos causadores de infecção no SNC.

Bactérias	Vírus	Fungos	Parasitas
Gram positivas	**DNA Vírus**	***Cryptococcus sp***	Protozoários
Streptococcus pneumoniae	**HSV-1/2**	*Aspergillus* sp	*Plasmodium falciparum*
Listeria monocytogenes	Citomegalovírus	*Histoplasma capsulatum*	*Toxoplasma gondii*
Acinetobacter calcoaceticus	Varicela Zoster	*Paracoccidiodis* sp	*Acanthamoeba* spp
Bacterioides spp	Epstein Barr	*Candida albicans*	*Balamuthia mandrillaris*
Staphylococcus aureus	HHV-6		*Naeglia fowleri*
Staphylococcus epidermitis	HHV-8		
	Adenovírus		**Helmintos**
Gram negativas	Vírus JC		***Cisticercus cellulosae***
***Haemophilus influenzae* B**			*Schistosoma mansoni*
Neisseria meningitidis	**RNA Vírus**		*Echinococcus granulosus*
Escherichia coli K1	**Enterovírus**		*Angiostrongylus cantonensis*
Klebsiella pneumoniae	Arbovírus (Zika, dengue, West Nile)		*Onchocerca* spp
Aerobacter spp	Vírus da coriomeningite linfocitária		
Citrobacter spp	Parechovirus		
Proteus spp	**HIV**		
Pseudomonas aeruginosa	HTLV-1/2		
Salmonella spp	Vírus da Caxumba		
Serratia spp	Vírus da Rubéola		
	Vírus do Sarampo		
Espiroquetas	Vírus da Raiva		
Treponema pallidum			
Leptospira spp			
Micobactérias			
Mycobacterium tuberculosis			

Fonte: Anghebem-Oliveira, 2016; Monticelli 2018; Deigendesch, 2017; Thompon, Thakur, 2017; Król-Turmi SKA & Olender, 2017.

principalmente para as bactérias mais frequentemente causadoras de meningite. Se possível, o LCR que será encaminhado para cultura de bactérias deve ser coletado em meio de transporte contendo ágar chocolate, pois isso aumenta a possibilidade de isolamento das bactérias.

O processamento do material inicia-se com sua centrifugação a 1.500 × g por 15 minutos, para posterior preparação de lâminas coradas e culturas a partir do sedimento (Brunzel, 2013).

A alíquota destinada para os testes de biologia molecular deve ser coletada em tubos livres de enzimas RNAse ou DNAse, que podem destruir o material genético que se propõe a pesquisar. Mesmo na disponibilidade de testes de biologia molecular, os testes microbiológicos tradicionais devem ser realizados.

Análise microscópica – colorações microbiológicas

A principal coloração utilizada para a análise microbiológica microscópica do LCR é a coloração de Gram. A coloração de Gram identifica bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, e cora todos os fungos como Gram-positivos. Quando realizada por profissionais bem treinados, a coloração de Gram apresenta uma sensibilidade de 60% a 90% e especificidade próxima de 100% (Anvisa).

As meningites crônicas estão entre as síndromes neurológicas de mais difícil investigação. Podem ser de etiologia infecciosa ou não infecciosa. Quando há suspeita clínica de infecção fúngica ou quando estruturas fúngicas são destacadas pela coloração de Gram, outras colorações específicas como a Tinta da China ou a nigrosina devem ser realizadas (Figura 14.22). Na suspeita clínica de neurotuberculose, a pesquisa direta de bacilos álcool-ácido resistentes deve ser feita pela coloração de Ziehl-Neelsen ou pela coloração modificada a frio Ziehl–Gabbet (Kent, 1985) ou auramina (Mundt, Shanahan).

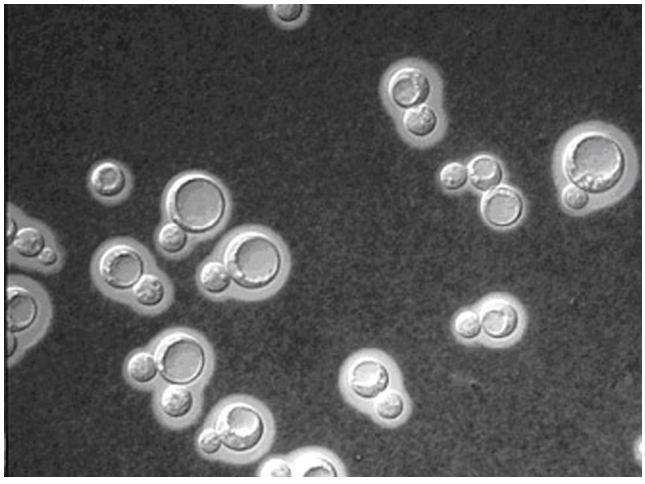


Figura 14.22 Criptococcus sp *com gemulações.* Coloração Tinta da China.
Fonte: Autores.

A coloração de Wright pode ser útil na identificação de amebas de vida livre. A *Naegleria fowleri* apresenta tamanho entre 15 e 20 micras, citoplasma azul celeste e núcleo violeta finamente granulado (Brunzel).

Culturas

Na suspeita de meningite aguda, as culturas do LCR devem sempre ser realizadas para identificação da bactéria e teste de sensibilidade aos antimicrobianos. As bactérias mais comumente causadoras de meningite bacteriana aguda em crianças acima de 30 dias e adultos são *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (Figuras 14.23 a 14.25). No período neonatal, as meningites bacterianas agudas *são causadas por* agentes Gram-negativos,

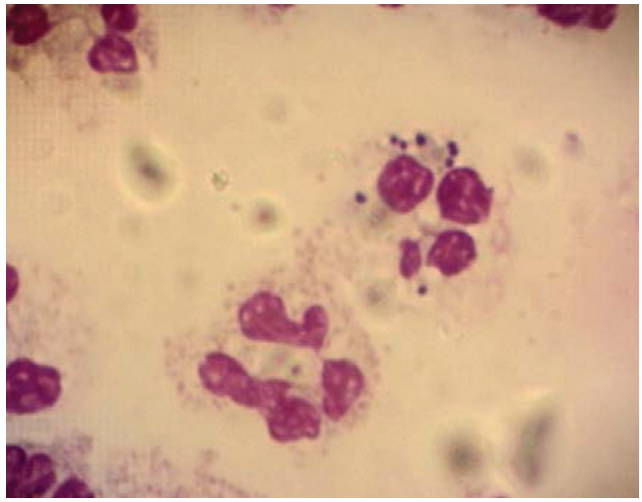


Figura 14.23 Bactérias intracelulares, sugestivas de *Neisseria meningitides* (Aumento 1.000×). Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

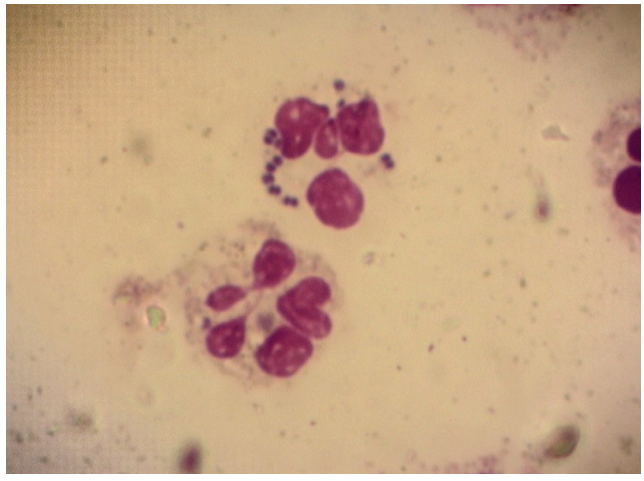


Figura 14.24 Bactérias intracelulares, sugestivas de *Neisseria meningitides* (Aumento de 1.000×). Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

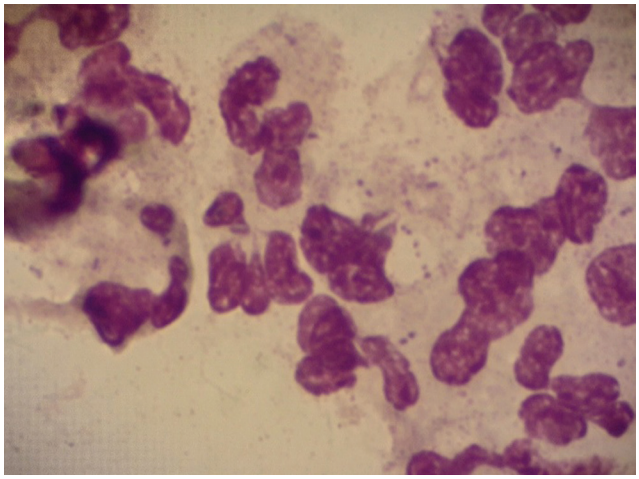


Figura 14.25 Bactérias intracelulares, sugestivas de *Streptococcus* pneumoniae (Aumento de 1.000×). Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

Tabela 14.14 Métodos imunológicos e principais aplicações.

Método	Aplicação
Teste de aglutinação com látex	*Criptococcus* sp. *Haemophilus influenza* *Streptococcus pneumoniae* *Neisseria meningitides*
Imunofluorescência indireta	*Cysticercus cellulosae*
ELISA – Pesquisa de anticorpos	*Cysticercus cellulosae* *Toxoplasma gondii*
VDRL	*Treponema pallidum*

ELISA: *Enzime-Linked Immunosorbent Assay*; VDRL: *Venereal Disease Research Laboratory*.
Fonte: Strasinger; Mundt; Anvisa.

principalmente estreptococos do grupo B (SGB – predominantemente do tipo III), *Escherichia coli* (particularmente as cepas contendo o polissacarídeo K1), *Listeria monocytogenes*, enterococos, estreptococos do grupo D não enterococos, estreptococos α-hemolíticos, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Citrobacter diversus.*

Após os procedimentos de coloração, o sedimento da amostra de LCR centrifugada é inoculado em caldo tioglicolato e semeado em placa de ágar sangue e em placa de ágar chocolate incubada a 37 °C, em atmosfera com 10% de CO_2. Para a identificação de *Neisseria meningitidis* recomenda-se o meio seletivo Thayer-Martin modificado. Na suspeita de *Haemophilus influenzae*, tiras de X-V podem ser aplicadas na placa de ágar sangue. A antibioticoterapia prévia à coleta do LCR reduz em cerca de 50% a chance de crescimento do agente infeccioso nos meios de cultura (Anvisa).

Para a pesquisa de fungos ou micobactérias, o sedimento deve ser semeado em meios específicos como ágar Sabouraud, Mycosel ou Lowenstein Jensen, respectivamente (Brunzel, Mundt, Anvisa).

ANÁLISE IMUNOLÓGICA

Os exames imunológicos são indicados na investigação das meningites bacterianas agudas, principalmente nos casos com LCR atípico ou casos parcialmente tratados, além da investigação de sífilis, *Criptococcus* sp, cisticercose, toxoplasmose, entre outros. Testes rápidos para detecção de antígenos ou anticorpos contra agentes causadores de infecções no SNC têm sido utilizados em serviços de emergência, mas não substituem as colorações microbiológicas e as culturas em função da possibilidade de resultados falso-positivos ou falso-negativos. A Tabela 14.14 especifica alguns métodos imunológicos e suas principais indicações.

Para investigação de sífilis no SNC, o VDRL (*Venereal Disease Laboratory*) no LCR é o método mais indicado. VDRL positivo faz o diagnóstico, porém, VDRL negativo não afasta neurosífilis. Testes treponêmicos como o FTA-abs (*Fluorescent treponemal antibody absorption*), MHA-TP (micro-hemaglutinação para *Treponema pallidum*) e TPPA (*Treponema pallidum particle agglutination assay*) podem apresentar resultados falso-positivos no LCR por detectar anticorpos produzidos sistemicamente e não intratecal. Amostras de LCR hemorrágicas, com acidente de punção, podem apresentar resultados falso-positivos tanto nos testes treponêmicos como não treponêmicos (Fishman, 1992).

A detecção do antígeno criptocócico no LCR é uma ferramenta essencial no diagnóstico de meningite por criptococos. Deve ser realizada no LCR de todos os pacientes HIV com suspeita de meningite ou quaisquer sintomas do SNC. A realização da detecção do antígeno criptocócico no LCR deve ocorrer independentemente de outros parâmetros do LCR alterados. Testes comercialmente disponíveis para detecção do antígeno criptocócico no LCR, por aglutinação de látex ou ELISA, estão disponíveis há vários anos. Recentemente foi descrito o ensaio de fluxo lateral para antígeno criptocócico no LCR (LFA), que detecta rapidamente a cápsula polissacarídica criptocócica usando anticorpos monoclonais anti-criptocócicos conjugados com ouro (Abassi *et al.*, 2015).

MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

As infecções virais do SNC são classificadas em meningites ou encefalites. As primeiras são causadas principalmente por enterovírus; as encefalites não epidêmicas são causadas principalmente por HSV-1, enquanto nas encefalites epidêmicas as arboviroses são causas relevantes (Van de Beek e Brouwer, 2017; Puccioni-Sohler *et al.*, 2013; Solomon, 2004).

Atualmente, a investigação dos agentes virais é feita por métodos de biologia molecular, e a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) é o método mais indicado. A positividade dos métodos de biologia molecular depende de uma série de fatores como: qualidade da amostra, a amostra deve sempre ser encaminhada em gelo e coletada em tubos adequados. O tempo decorrido entre o início dos sintomas e a coleta da amostra é importante (Figura 14.26). A acurácia dos métodos de biologia molecular varia de acordo com o agente envolvido.

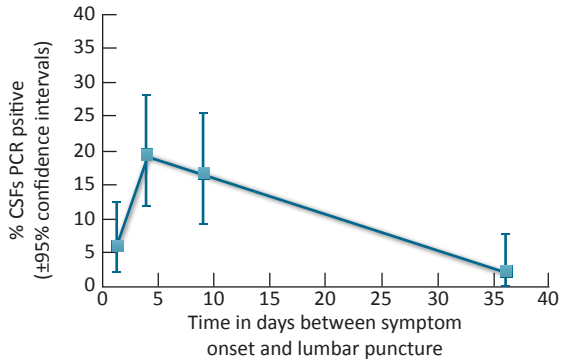


Figura 14.26 Relação da detecção por PCR com atraso entre início dos sintomas neurológicos e punção lombar.
Fonte: Davies NWS *et al.*, 2005.

A quantificação de carga viral do HIV pode ser realizada, porém, atualmente possui indicação clínica limitada. Está indicada no caso de alterações neurológicas, principalmente no distúrbio neurocognitivo associada ao HIV (Hand), com suspeita de escape do HIV no SNC. O escape do HIV no SNC é definido quando há aumento da carga viral de pelo menos um log no LCR maior que o sangue periférico.

O sequenciamento de nova geração permite identificar compartimentalização do HIV no SNC, isto é, quando há o desenvolvimento de espécies diferentes no LCR comparadas com o sangue periférico (Figura 14.27), sendo indicado apenas para pesquisa.

Para investigação dos agentes etiológicos das meningites bacterianas agudas estão disponíveis métodos de biologia molecular, PCR multiplex em tempo real, porém, estes métodos precisam ser mais bem avaliados no LCR (Steiner, 2012). O mesmo é válido para os métodos de biologia molecular para diagnóstico de neurotuberculose, inclusive GeneXpert (Steniner, 2012; Katoch, 2004).

Seguem nas Figuras 14.28 a 14.36 imagens de células e microrganismos encontrados em amostras de líquido cefalorraquidiano objetivando auxiliar no esclarecimento das dúvidas em relação ao LCR.

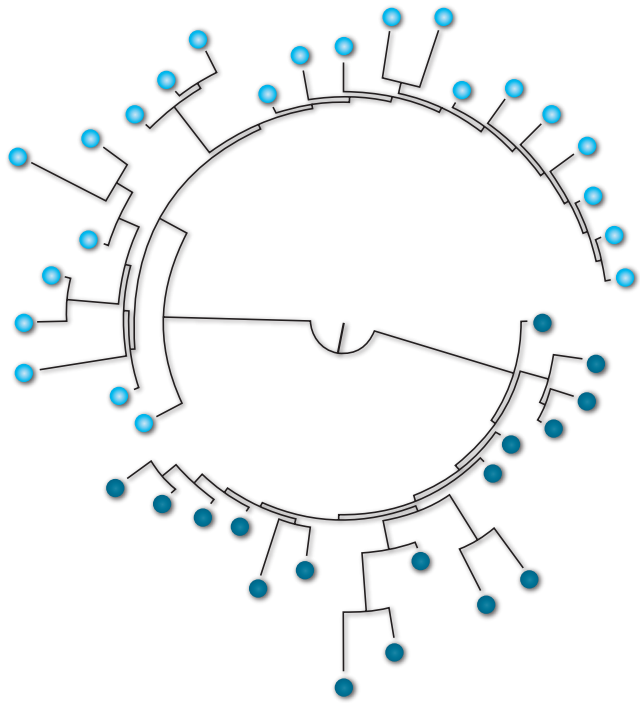
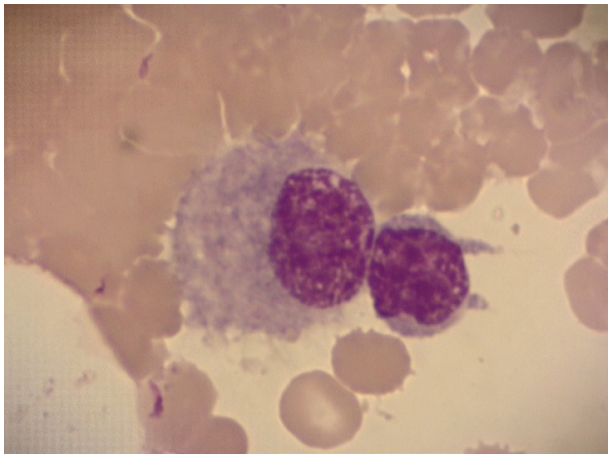


Figura 14.27 Árvore de máxima verossimilhança de sequências parciais de HIV (C2-V3) do LCR e células mononucleares do sangue periférico (PBMC).
A topologia da árvore revelou evidências de variantes monofiléticas do HIV em PBMC (pontos pretos) e CSF (pontos cinzentos). A compartimentalização do HIV entre PBMC e CSF foi confirmada por *FST approach*, $p < 0{,}01$.
Fonte: Almeida *et al.*, 2017.



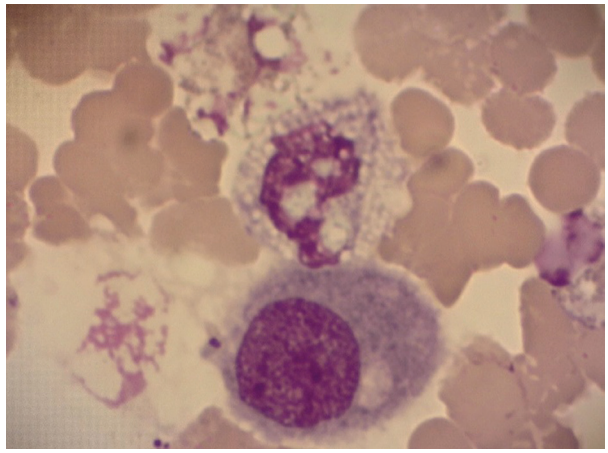


Figura 14.28 Células ependimárias (Aumento 1.000×). Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

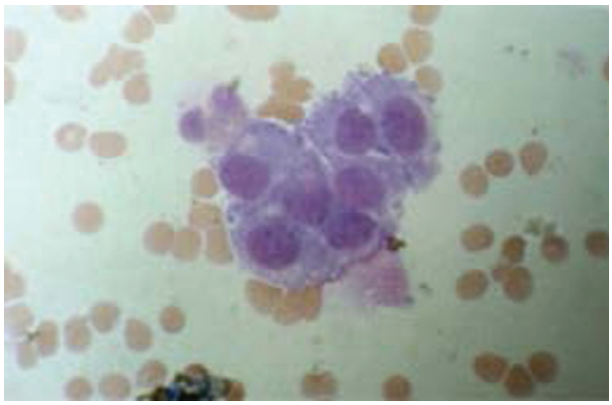


Figura 14.29 Células do plexo coroide (Aumento 1.000×). Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Strasinger, Lorenzo, 2009.

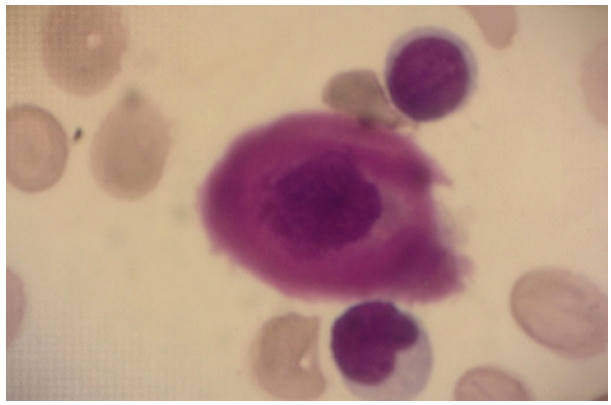


Figura 14.30 Condrócito (Aumento 1.000×). Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

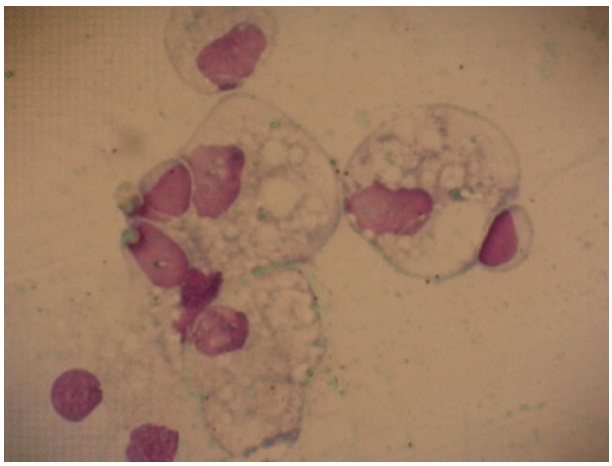


Figura 14.31 Macrofágos (Aumento 1.000×). Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

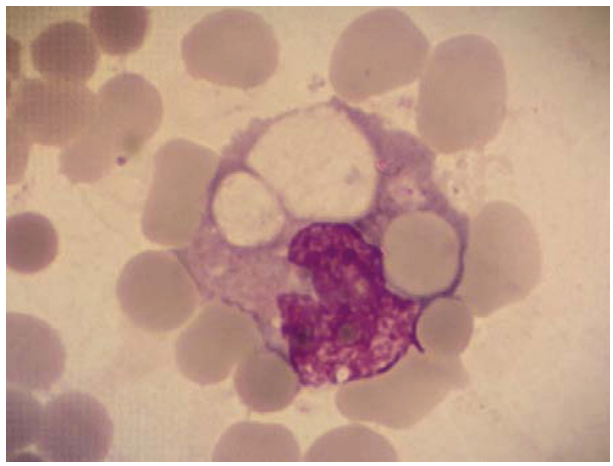


Figura 14.32 Eritrofágos (Aumento 1.000×). Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

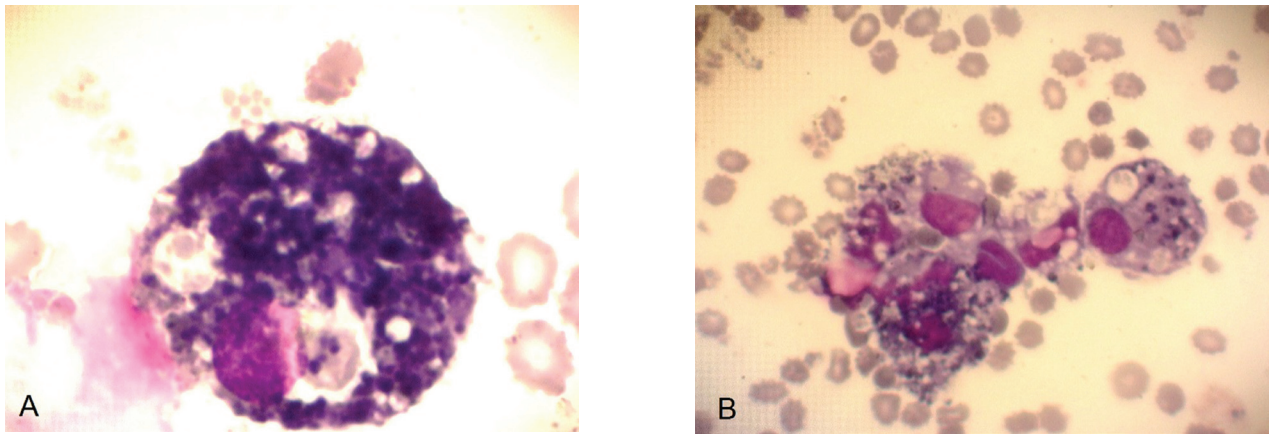


Figura 14.33 **(A)** Macrofágo com hemossiderina (sideroﬁgo) (Aumento 1.000×), **(B)** Agrupamento de macrófagos com hemossiderina (Aumento 400×). Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

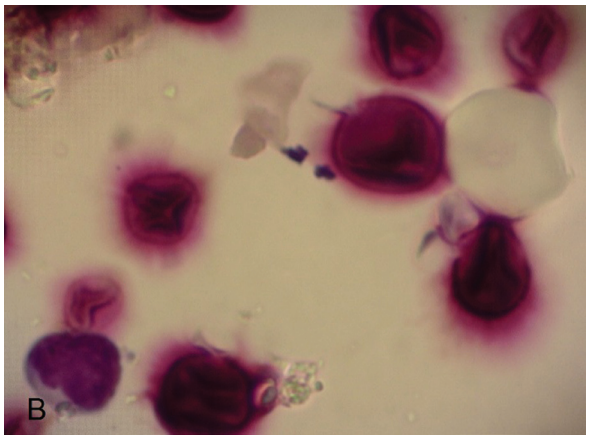


Figura 14.34 *Criptococcus sp* (Aumento 1.000×).
Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

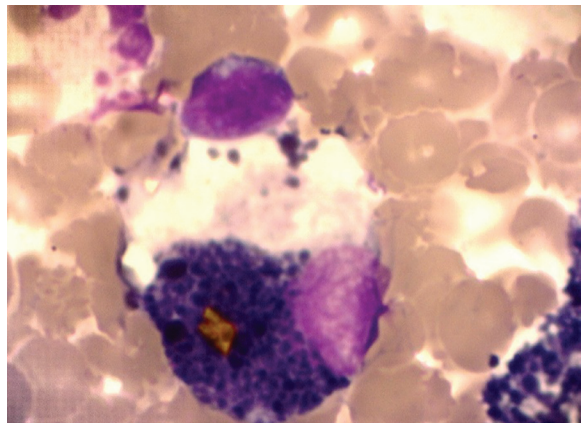


Figura 14.35 Macrofágo com cristal de hematoidina (Aumento 1.000×). Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

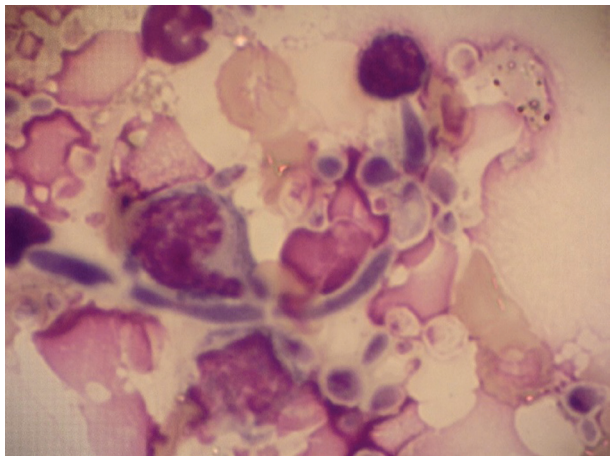


Figura 14.36 *Candida albicans* (Aumento 400×). Coloração de May Grunwald-Giemsa.
Fonte: Autores.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Key A, Retzius G. Studien in der anatomie des nervensystemes. Archiv Mikrosk Anatomie 1873; 9:308.
2. Albright Jr RE. Management of cerebrospinal fluid an other body fluids. In: Koepke JA. Practical hematology laboratory. New York: Churchill Livingstone; 1991. p. 295-310.
3. Frederiks JA, Koehler PJ. The first lumbar puncture. J Hist Neurosci 1997; 6(2):147-53.
4. Johanson CE, Duncan III JA, Klinge PM, et al. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease. Cerebrospinal Fluid Res 2008; 5:10.
5. Oshio K, Watanabe H, Song Y, et al. Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel aquaporin-1. Faseb J 2005; 19:76-8.
6. Weaver C, Mcmillan P, Duncan JA, et al. Hydrocephalus disorders: their biophysical and neuroendocrine impact on the choroid plexus epithelium. Advan Mol Cell Biol 2004; 31:269-93.
7. Torzewski M, Lackner KJ, Bohl J, et al. Integrated cytology of cerebrospinal fluid. Berlin: Springer; 2008.
8. Galagan KA, Blomberg D, Glassy EF, et al. Color atlas of body fluids: an illustrated field guide based on proficiency testing. Chicago: College of American Pathologists; 2006.
9. Blomberg DJ, Galagan K, Glassy E. Body fluid analysis. In: Kottke-Marchant K, Davis B. Laboratory hematology practice. Singapore: Willey-Blackwell; 2012. p. 615-25.
10. Hussong JW, Kjeldsberg CR. Kjeldsberg's body fluid analysis. Chicago: ASCP Press; 2015.
11. Egnor M, Zheng L, Rosiello A, et al. A model of pulsations in communicating hydrocephalus. Pediatr Neurosurg 2002; 36:281-303.
12. Stoquart-Elsankari S, Baledent O, Gondry-Jouet C, et al. Aging effects on cerebral blood and cerebrospinal fluid flows. J Cereb Blood Flow Metab 2007; 27:1563-72.
13. Rennels ML, Blaumanis OR, Grady PA. Rapid solute transport throughout the brain via paravascular fluid pathways. Adv Neurol 1990; 52:431-39.
14. Proescholdt MG, Hutto B, Brady LS, et al. Studies of cerebrospinal fluid flow and penetration into brain following lateral ventricle and cisterna magna injections of the tracer [14C] inulin in rat. Neuroscience 2000; 95(2):577-92.
15. Boulton M, Flessner M, Armstrong D, et al. Contribution of extracranial lymphatics and arachnoid villi to the clearance of a CSF tracer in the rat. Am J Physiol 1999; 276(3 Pt 2):R818-23.
16. Zakharov A, Papaiconomou C, Koh L, et al. Integrating the roles of extracranial lymphatics and intracranial veins in cerebrospinal fluid absorption in sheep. Microvasc Res 2004;67(1):96-104.
17. Luedemann W, Kondziella D, Tienken K, et al. Spinal cerebrospinal fluid pathways and their significance for the compensation of kaolin-hydrocephalus. Acta Neurochir Suppl 2002;81:271-3.
18. Miyajima M, Arai H. Evaluation of the production and absorption of cerebrospinal fluid. Neurol Med Chir 2015; 55(8):647-57.
19. Jones HC. Review of "the blood-cerebrospinal fluid barrier". Cerebrosp Fluid Res 2006; 3:12.
20. Skipor J, Thierry J. The choroid plexus - cerebrospinal fluid system: undervaluated pathway of neuroendocrine signaling into the brain. Acta Neurobiol Exp (Wars) 2008; 68(3):414-28.
21. Redzic ZB, Preston JE, Duncan JA, et al. The choroid plexus--cerebrospinal fluid system: from development to aging. Curr Top Dev Biol 2005; 71:1-52.
22. Silverberg GD, Heit G, Huhn S, et al. The cerebrospinal fluid production rate is reduced in dementia of the Alzheimer's type. Neurology 2001;57(10):1763-6.
23. Fishman RA. Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 1992.
24. Seehusen DA, Reeves MM, Fomin DA. Cerebrospinal fluid analysis. Am Family Phys 2003; 68(6):1103-8.
25. Pinto JR. Simulação hidrodinâmica e caracterização experimental de mecanismos anti-sifão em sistemas de drenagem externa de líquido cefalorraquidiano. Dissertação [Mestrado]. Universidade Estadual São Paulo; 2009.
26. Silverberg GD, Mayo M, Saul T, et al. Alzheimer's disease, normal-pressure hydrocephalus, and senescent changes in CSF circulatory physiology: a hypothesis. Lancet Neurol 2003; 2(8):506-11.
27. Sotelo J, Izurieta M, Arriada N. Treatment of hydrocephalus in adults by placement of an open ventricular shunt. J Neurosurg 2001; 94(6):873-9.
28. Pople IK. Hydrocephalus and shunts: what the neurologist should know. J Neurol Neurosurg Psych 2002; 73(Suppl 1):i17-22.
29. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Body fluid analysis for cellular composition; Approved Guideline. CLSI document H56-A. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
30. Macchiaverni LM, Barros Filho AA. Perímetro cefálico: por que medir sempre. Medicina (Ribeirão Preto) 1998; 31:595-609.
31. Ennis SR, Keep RF. The effects of cerebral ischemia on the rat choroid plexus. J Cereb Blood Flow Metab 2006; 26(5):675-83.
32. Almeida SM, Nogueira MB, Raboni SM, et al. Laboratorial diagnosis of lymphocytic meningitis. Braz J Infect Dis 2007; 11(5):489-95.
33. Ferreira WF, Ávila SL. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
34. Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2006.
35. Vieira JF. Incidência de meningite em pacientes de 0-12 anos no Instituto de Medicina Tropical de Manaus. Arq Neuropsiquiatr 2001; 59(2-A):227-9.
36. Practice parameters: lumbar puncture (summary statement). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Neurology 2005; 65(3 Pt 1):510-12.
37. Engelborghs S, Niemantsverdriet E, Struyfs H, et al. Consensus guidelines for lumbar puncture in patients with neurological diseases. Alzheimers Dement (Amst) 2017; 8:111-6.
38. Brasil. Conselho Nacional de Saúde. Resolução n° 196, de 10 de outubro de 1996. Aprova normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Brasília: Diário Oficial da União; 1996.

39. Puccioni-Sohler M, Machado LR, Canuto R, et al. Coleta do líquido cefalorraquidiano, termo de consentimento livre e esclarecido e aspectos éticos em pesquisa. Arq Neuropsiquiatr 2002; 60(3-A):681-4.
40. Portela LA, Souza V, Pahl FH, et al. Laceration of the posterior inferior cerebellar artery by suboccipital puncture of the cisterna magna: case report. Arq Neuropsiquiatr 2004; 62(3B):882-4.
41. Henry J. Diagnósticos clínicos e tratamento por método Laboratorial. 20 ed. São Paulo: Manole; 2008.
42. Strasinger SK, Di Lorenzo MS. Urinálise e fluidos corporais. 5 ed. São Paulo: Livraria Médica Paulista; 2009.
43. Melo CL, Martins AM, Martins RD, et al. Análise laboratorial do líquido cefalorraquidiano. Rev Bras Anal Clín 2003; 35(3):109-12.
44. Moura RA. Colheita de material para exames de laboratório. São Paulo: Atheneu; 1998.
45. Comar SR, Machado NA, Dozza TG, et al. Análise citológica do líquido cefalorraquidiano. Estudos Biol 2009; 31(73/74/75):93-102.
46. Gall JJ. Laboratory evaluation of body fluids. In: Stiene-Martin A, Lotspeich-Steininger C, Koepke JA. Clinical hematology: principles, procedures, correlations. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott; 1998. p.400-14.
47. Mundt LA, Shanahan K. Exame de urina e de fluidos corporais de Graff. 2 ed. São Paulo: Artmed; 2012.
48. Arora S, Swadron SP, Dissanayake V. Evaluating the sensitivity of visual xanthochromia in patients with subarachnoid hemorrhage. J Emerg Med 2010; 39(1):13-6.
49. Reis JB, Bei A, Reis Filho JB. Líquido cefalorraquiano. São Paulo: Sarvier; 1980.
50. Kjeldsberg C, Knight J. Body fluids: laboratory examination of cerebro espinal, seminal, serous & sinovial fluids. 3rd ed. Chicago: American Society of Clinical Pathologists; 1993. 399p.
51. Jerrard DA, Hanna JR, Schindelheim GL. Clinical laboratory in emergency medicine: cerebrospinal fluid. J Emerg Med 2001;21(2):171-8.
52. Marlet J, Barreto Fonseca J. Experimental determination of time of intracranial hemorrhage by spectrophotometric analysis of cerebrospinal fluid. J Foren Sci 1982;27(4):880-8.
53. Kronholm V, Lintrup J. Spectrophotometric investigation of the cerebrospinal fluid in the near ultraviolet region. A possible diagnostic aid in diseases of the central nervous system. Acta Psychiatr Neurol Scand 1960; 35(3):314-29.
54. Lima AO, Soares JB, Greco JB, et al. Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
55. Glantz M, Cole B, Glantz L. Cerebrospinal fluid cytology in patients with cancer: minimizing false-negative results. Cancer 1998; 82(4):733-9.
56. Bru CM, Alabern IL. Recomendaciones para el estudio de las proteínas del líquido cefalorraquídeo. Quím Clín 2002; 21(2):83-90.
57. Dimas LF, Sohler MP. Exame do líquido cefalorraquidiano: influência da temperatura, tempo e preparo da amostra na estabilidade analítica. J Bras Patol Med Lab 2008; 44(2):97-106.
58. Gilhus NE, Barnes M, Brainin, M. European handbook of neurological management. 2nd ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2011.
59. Marshall WJ, Lapsley M, Day AP, et al. Bioquímica clínica: aspectos clínicos e metabólicos. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.
60. Ravel R. Laboratório clínico. Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.
61. Venkatesh B, Scott P, Ziegenfuss M. Cerebrospinal fluid in critical illness. Crit Care Resus 2000; 2(1):42-54.
62. Nigrovic LE, Shah SS, Neuman MI. Correction of cerebrospinal fluid protein for the presence of red blood cells in children with a traumatic lumbar puncture. J Pediatr 2011; 159(1):158-9.
63. Gnutzmann LV, Plewka J, Suldofski MT, et al. Analysis of reference values of cerebrospinal fluid. Rev Bras Anali Clin 2016;48(3):189-97.
64. Reske A, Haferkamp G, Hopf HC. Influence of artificial blood contamination of the analysis of cerebrospinal fluid. J Neurol 1981;226(3):187-93.
65. Leite AA, Honório SR, Torres GR, et al. Análise do líquido cefalorraquidiano. Revisão de Literatura. Atlas de Ciências da Saúde 2016; 4(3):1-24.
66. Burtis CA, Bruns DE. Tietz fundamentos de química clínica e diagnóstico molecular. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.
67. Zaia DA, Zaia CT, Lichtig J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. Quím Nova 1998; 21(6):787-93.
68. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis – disease-related data patterns and evaluation programs. J Neurol Sci 2001;184(2):101-22.
69. Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) a concept common to normal blood - CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. J Neurol Sci 1994;122(2):189-203.
70. Chaves ML, Finkelsztejn A, Stefani M, et al. Rotinas em neurologia e neurocirurgia. Porto Alegre: Artmed; 2008.
71. Herndon RM, Brumback RA. The cerebrospinal fluid. Boston: Kluwer Academic; 2012.
72. Gama PD, Machado LR, Livramento JA, et al. Study of oligoclonal bands restricted to the cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients in the city of São Paulo. Arq Neuropsiquiatr 2009;67(4):1017-22.
73. Awad A, Hemmer B, Hartung HP, et al. Analyses of cerebrospinal fluid in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2010; 219(1-2):1-7.
74. Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. J Neurol Neurosurg Psychiat 1994; 57(8):897-902.
75. Almeida SM, Faria FL, Fontes KG, et al. Quantitation of cerebrospinal fluid lactic acid in infectious and non-infectious neurological diseases. Clin Chem Lab Med 2009; 47(6):755-61.
76. Mesejo A, Juan M, Serrano A. Cirrosis y encefalopatia hepáticas: consecuencias clínico-metabólicas y soporte nutricional. Nutr Hosp 2008; 23(2):8-18.
77. Nussinovitch M, Prais D, Finkelstein Y, et al. Lactic dehydrogenase isoenzymes in cerebrospinal fluid of children with Guillain-Barré syndrome. Arch Dis Child 2002; 87(3):255-7.
78. Miranda E, Peruchi MM, Lin J, et al. Atividade de adenosina desaminase no líquido cefalorraquidiano. Rev Bras Neurol 2008; 44(2):5-11.

79. Feres MC, Martino MC, Maldijian S, et al. Validação laboratorial de um método automatizado de dosagem da atividade de adenosina desaminase em líquido pleural e em líquido cefalorraquidiano. J Bras Pneumol 2008; 34(12):1033-9.
80. Anvisa. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2004.
81. Blennow KA. Review of fluid biomarkers for Alzheimer`s disease: moving from CSF to blood. Neurol Ther 2017; 6(1):15-24.
82. Brinkmalm G, Sjödin S, Simonsen AH. A parallel reaction monitoring mass spectrometric method for analysis of potential CSF biomarkers for Alzheimer's disease. Proteomics Clin Appl 2018; 12(1).
83. Brunzel NA. Fundamentals of urine and body fluids analysis. 3rd ed. St. Louis: Elsevier; 2013.
84. Deigendesch N, Costa Nunez J, Stenzel W. Parasitic and fungal infections. Handb Clin Neurol 2017; 145:245-62.
85. Hajduková L, Sobek O, Prchalová D, et al. Biomarkers of brain damage: S100B and NSE concentrations in cerebrospinal fluid--a normative study. Biomed Res Int 2015; 2015:379071.
86. Mantur M, Łukaszewicz-Zajńc M, Mroczko B, et. al. Cerebrospinal fluid leakage--reliable diagnostic methods. Clin Chim Acta 2011; 412(11-12):837-40.
87. Król-Turmińska K, Olender A. Human infections caused by free-living amoebae. Ann Agric Environ Med 2017; 24(2):254-60.
88. Menezes MB, Anghebem-Oliveira MI. Parasitoses emergentes pouco conhecidas no Brasil. Laes/Haes 2017; 1:1-8.
89. Monticelli J, Geremia N, D'agaro P, et al. Aseptic central nervous system infections in adults: what predictor for unknown etiological diagnosis? Neurol Sci 2018;39(5):863-70.
90. Pfanner T, Henri-Bhargava A, Borchert S. Cerebrospinal fluid biomarkers as predictors of shunt response in idiopathic normal pressure hydrocephalus: a systematic review. Can J Neurol Sci 2018; 45(1):3-10.
91. Rosadas C, Puccioni-Sohler M. Relevance of retrovirus quantification in cerebrospinal fluid for neurologic diagnosis. J Biomed Sci 2015;22:66.
92. Strasinger SK, Di Lorenzo MS. Urinalysis and body fluids. Philadelphia: The FA Davis Company; 2008.
93. Thompson H, Thakur K. Infections of the central nervous system in returning travelers and immigrants. Curr Infect Dis Rep 2017; 19(11):45.
94. Reske A, Haferkamp G, Hopf HC. Influence of artificial blood contamination of the analysis of cerebrospinal fluid. J Neurol 1981;226(3):187-93.
95. Nigrovic LE, Shah SS, Neuman MI. Correction of cerebrospinal fluid protein for the presence of red blood cells in children with a traumatic lumbar puncture. J Pediatr 2011;159(1):158-9.
96. Whitmore EL, Hochberg F, Wolfson L, et al. Quantitative cytocentrifugation in the evaluation of cerebrospinal fluid. Acta Cytol 1982;26(6):847-50.
97. Bigner SH, Johnston WW. The cytopathology of cerebrospinal fluid. II. Metastatic cancer, meningeal carcinomatosis and primary central nervous system neoplasms. Acta Cytol 1981;25(5):461-79.
98. luge H, Roskos M, Kluska MM. Cell preparation (sedimentation) and staining. In: Kluge H, Wieczorek V, Linke E, et al. Atlas of CSF cytology. Stuttgart: Thieme; 2007. p. 8-9.
99. Deisenhammer F, Sellebjerg F, Teunissen CE. Cerebrospinal fluid in clinical neurology. New York: Springer; 2015.
100. Almeida SM, Rotta I, Conto AJ, et al. Higher positive identification of malignant CSF cells using the cytocentrifuge than the Suta chamber. Arq Neuropsiquiatr 2016;74(10):816-22.
102. Almeida SM, Nakanishi E, Conto AJ, et al. Cerebrospinal fluid cytological and biochemical characteristics in the presence of CNS neoplasia. Arq Neuropsiquiatr 2007;65(3B):802-9.
104. MacKenzie JM. Malignant meningitis: a rational approach to cerebrospinal fluid cytology. J Clin Pathol 1996; 49(6):497-9.
105. Fleming C, Russcher H, Lindemans J, et al. Clinical relevance and contemporary methods for counting blood cells in body fluids suspected of inflammatory disease. Clin Chem Lab Med 2015;53(11):1689-706.
106. Broussalis E, Hutterer M, Oppermann K, et al. Isolated leptomeningeal infiltration of a primary CNS B-cell lymphoma diagnosed by flow cytometry and confirmed by necropsy. Acta Neurol Scand 2012;126(3):e11-6.
107. Almeida SM, Faria FL, de Goes FK, et al. Quantitation of cerebrospinal fluid lactic acid in infectious and non-infectious neurological diseases. Clin Chem Lab Med 2009;47(6):755-61.
108. Davies NW, Brown LJ, Gonde J, et al. Factors influencing PCR detection of viruses in cerebrospinal fluid of patients with suspected CNS infections. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2005;76(1):82-7.
109. Kent PT. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta: Center for Disease Control; 1985.
110. Almeida SM, Souza CV, Pletsch L, et al. Diagnostic validity of eosinophilis in CSF on HIV-infected and non HIV patients. 2018 (no prelo).
111. Petzold A, Sharpe LT, Keir G. Spectrophotometry for cerebrospinal fluid pigment analysis. neurocrit. Care 2006; Neurocrit Care 2006;4(2):153-62.
112. de Almeida SM, Rotta I, Ribeiro CE, et al. Dynamic of CSF and serum biomarkers in HIV-1 subtype C encephalitis with CNS genetic compartmentalization-case study. J Neurovirol 2017;23(3):460-73.
113. Livramento JA, Machado LR. The history of cerebrospinal fluid analysis in Brazil. Arq Neuropsiquiatr 2013; 71(9B):649-52.
114. Reiber H, Thompson EJ, Grimsley G, et al. Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis: international consensus by an Internet-based group discussion. Clin Chem Lab Med 2003;41(3):331-7.
115. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging -Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement 2011;7(3):263-9.

116. Abassi M, Boulware DR, Rhein J. Cryptococcal meningitis: diagnosis and management update. Curr Trop Med Rep 2015;2(2):90-9.
117. Puccioni-Sohler M, Rosadas C, Cabral-Castro MJ. Neurological complications in dengue infection: a review for clinical practice. Arq Neuropsiquiatr 2013;71(9B):667-71.
118. Solomon T. Flavivirus encephalitis. N Engl J Med 2004; 351(4):370-8.
119. van de Beek D, Brouwer MC. CNS Infections in 2016: 2016, the year of Zika virus. Nat Rev Neurol 2017 13(2):69-70.
120. de Almeida SM, Rotta I, Ribeiro CE, et al. Dynamic of CSF and serum biomarkers in HIV-1 subtype C encephalitis with CNS genetic compartmentalization-case study. J Neurovirol. 2017;23(3):460-73.
121. Katoch VM. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. Indian J Med Res 2004;120(4):418-28.
122. Steiner I, Schmutzhard E, Sellner J, et al. EFNS-ENS guidelines for the use of PCR technology for the diagnosis of infections of the nervous system. Europ J Neurol 2012;19(10):1278-97.
123. Almeida SM. Biomarcadores no LCR para diagnóstico diferencial entre as meningites agudas. 45° Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial. Anais. Florianópolis, SC, 16-19 agosto, 2011.

15

capítulo

Orildo dos Santos Pereira

Líquido Seminal

ANATOMIA DO APARELHO REPRODUTOR MASCULINO

O aparelho reprodutor masculino é formado basicamente por tubos e condutos (testículos, epidídimo, canal deferente e ducto ejaculador), glândulas acessórias (próstata e uretrais) e o pênis, conforme representado pela Figura 15.1.

Testículos

São em número de dois e medem cerca de 3,5 a 4,5 cm em seu maior diâmetro, e 2,5 cm na largura. São formados pelos túbulos seminíferos, onde são formados os espermatozoides. Cada testículo é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, de cor branquicenta, que recebe o nome de túnica albugínea.

Os túbulos seminíferos são cilíndricos e representam 70% dos testículos. Seu comprimento varia de 40 a 70 cm, e o diâmetro entre 150 e 280 micra. Os túbulos seminíferos são enovelados e perdem sua tortuosidade em seu extremo interno, transformando-se em tubo reto para desembocar numa estrutura chamada *retis testis,* a qual, através dos canais eferentes, estabelece conexão entre o testículo e suas vias excretoras, que são o epidídimo e o canal deferente.

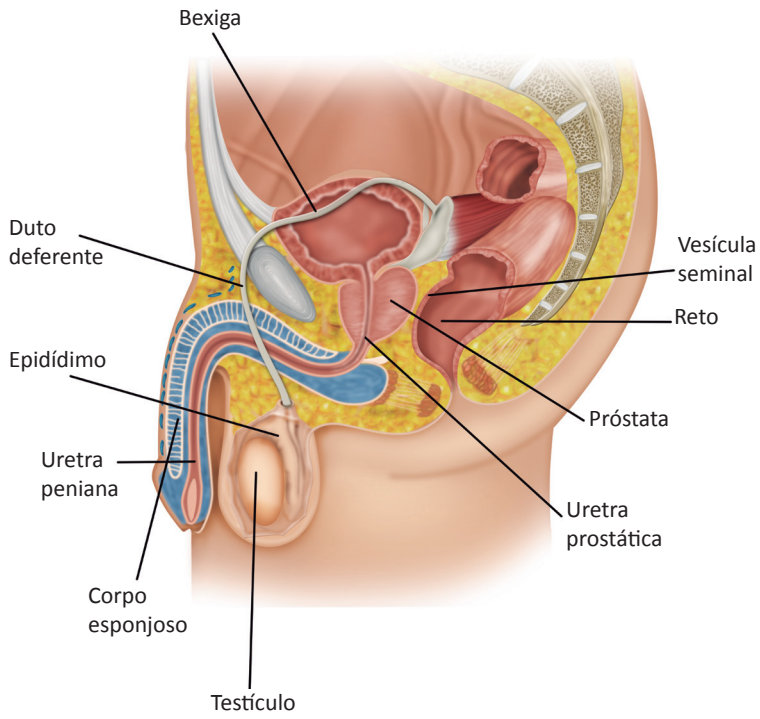


Figura 15.1 Aparelho reprodutor masculino.
Fonte: Pereira O.S., Janini J.B.M., 2001.

Os túbulos seminíferos apresentam uma luz central e um epitélio estratificado constituído pelas células de Sertoli e células germinativas.

O tecido intersticial entre os túbulos seminíferos é formado por células de Leydig, vasos sanguíneos, canais linfáticos e numerosos macrófagos. Têm a função de produção dos espermatozoides e elaboração de secreções internas.

As funções das células de Sertoli são de nutrição e suporte físico do epitélio germinativo, e de mediar o mecanismo de ação do FSH. Nas células de Sertoli estão os receptores de membranas específicas para o FSH e, ainda, são responsáveis pela produção de ABP (proteína ligadora de androgênios) e inibina, hormônio que faz o retrocontrole negativo da secreção e liberação do FSH. Têm atividade esteroidogênica e fagocitam as células que se degeneram durante a espermiogênese ao nível do epitélio germinativo.

As células de Leydig são responsáveis pela síntese de testosterona sob ação do LH para o qual têm receptores específicos de membrana.

Epidídimo

Apresenta-se como uma curvatura côncava para baixo, situada sobre o testículo. O epidídimo é dividido em três partes: cabeça, corpo e cauda. É um tubo único, extremamente convoluto, medindo de 4 a 6 metros de comprimento, e tem como função a maturação, o armazenamento e a condução dos espermatozoides.

Ductos deferentes

Medem cerca de 35 a 40 cm de comprimento, 2 mm de diâmetro, e a luz não ultrapassa 0,5 mm. Iniciam a partir da cauda do epidídimo e terminam no ponto de junção das vesículas seminais e do conduto ejaculador. A extremidade terminal é alargada, formando a parte ampolar, que se unindo ao ducto da vesícula seminal, vão dar origem ao canal ejaculador que desemboca na uretra prostática.

Vesículas seminais

Medem cerca de 5 a 7 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro na porção mais larga. Localizam-se entre a bexiga e o reto. Cada uma se liga à porção final de cada um dos canais deferentes. Sua função é a de promover a mistura dos espermatozoides com as secreções condutoras e nutritivas, a fim de formar o sêmen. São estruturas alongadas e receberam o nome de vesículas seminais, por serem consideradas reservatórios de sêmen, com capacidade para armazenar de 4 a 6 mL de líquido. Têm como função a mistura dos espermatozoides com as secreções condutoras e nutritivas para formar o sêmen, e são responsáveis pela sua coagulação.

Ductos ejaculadores

Medem cerca de 2 cm de comprimento e seu calibre diminui de cima para baixo, sua luz inicia com 1 mm e termina com 0,5 mm. Anatomicamente, se formam na terminação em ângulo agudo dos canais deferentes e das vesículas seminais. Penetram obliquamente na próstata, para baixo, e terminam na uretra posterior ao nível do utrículo prostático. Têm como função a mistura dos espermatozoides com as secreções condutoras e nutritivas para formar o sêmen.

Próstata

É uma glândula situada na cavidade pélvica e forma corpo com a bexiga e a uretra. A uretra passa pelo meio da próstata, e nesse trajeto recebe o nome de uretra prostática. Tem como função a mistura dos espermatozoides com as secreções condutoras e nutritivas para formar o sêmen e são responsáveis pela sua liquefação.

Uretra

Mede cerca de 17 a 20 cm de comprimento e vai do trígono da bexiga até a ponta do pênis. Anatomicamente, apresenta orifício uretral interno, uretra prostática, uretra membranosa, uretra cavernosa e orifício uretral externo. Tem como função a eliminação do sêmen.

Pênis

O pênis, a uretra e as glândulas acessórias são as únicas partes do aparelho genital masculino que têm funções conjuntas com o aparelho urinário.

O pênis é constituído de três formações cilíndricas, sendo duas localizadas lateralmente e conhecidas como corpos cavernosos, e uma localizada medianamente, conhecida como corpo esponjoso, que abriga a uretra. O tecido dos corpos cavernosos é irrigado por grandes veias sinusais que contêm pouco sangue, quando o pênis está em repouso, mas tornam-se fortemente ingurgitadas e dilatadas quando em ereção. Tem como função a eliminação do sêmen.

Glândulas acessórias

- **Glândulas de Littré:** localizadas no tecido periuretral da uretra peniana e são mais numerosas na cobertura da uretra.
- **Glândulas de Cowper:** localizadas na uretra membranosa.
- **Glândulas de Morgani:** localizadas na cobertura da uretra peniana e dentro dos quais as glândulas de Littré se esvaziam.

CARACTERÍSTICAS DO PLASMA SEMINAL

O plasma seminal é composto pela secreção das glândulas uretrais (cerca de 1% do volume seminal), secreção prostática (13% a 23% do volume seminal), sendo os componentes desta responsáveis pela liquefação do sêmen e pela secreção das vesículas seminais (46% a 80% do volume seminal), responsáveis pela coagulação do sêmen.

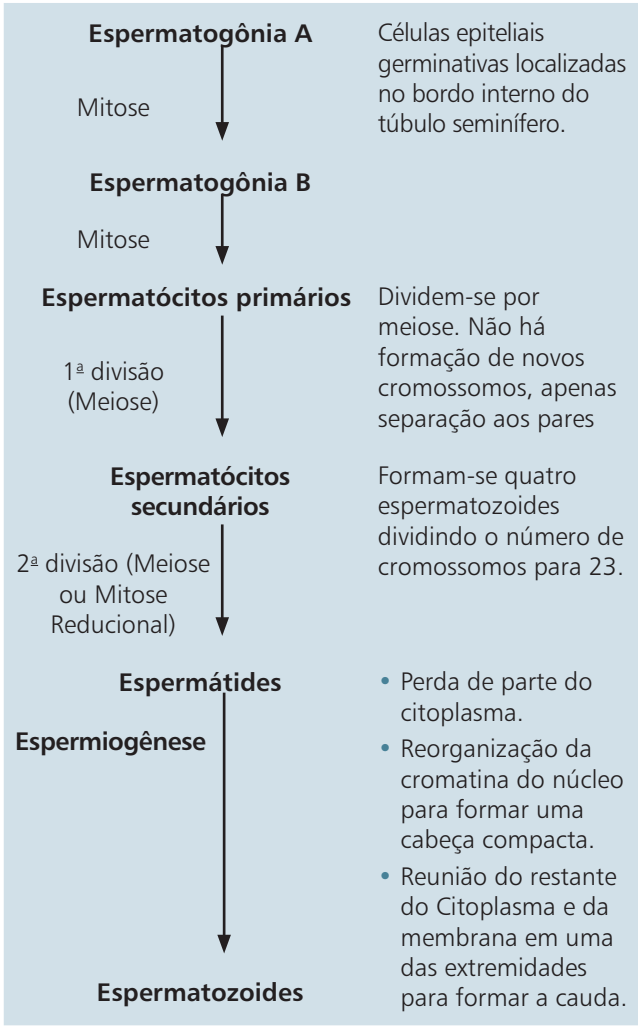
Também compõem o plasma seminal hormônios como FSH, LH, Testosterona, DHT e Prolactina.

ESPERMATOGÊNESE

Início entre 13 e 15 anos de idade sob a ação dos hormônios gonadotróficos adeno-hipofisários, permanecendo praticamente pelo resto da vida. É dividida em fase proliferativa (divisão das espermatogônias), fase meiótica (divisão reducional) e espermiogênese (transformação da espermátide em espermatozoide maduro) e o processo como um todo dura em torno de 70 a 74 dias.

Fases da espermatogênese

O esquema abaixo resume as fases da espermatogênese.



Ações hormonais sobre a espermatogênese

Os hormônios são fatores indispensáveis à espermatogênese. São eles:

- **Hormônio do crescimento (HGH):** promove a divisão inicial das espermatogônias. Na ausência desse hormônio, a espermatogênese é deficiente ou totalmente ausente.
- **Hormônio folículo estimulante (FSH):** secretado pelo lobo anterior da hipófise, penetra no túbulo seminífero e estimula a síntese proteica através dos receptores específicos existentes na célula de Sertoli.
- **Hormônio luteinizante (LH):** secretado pelo lobo anterior da hipófise, penetra no túbulo seminífero e estimula as células de Leydig a secretar testosterona.
- **Testosterona:** regula a concentração periférica do LH e atua sinergicamente com o FSH sobre a produção dos espermatozoides. A testosterona inicia a espermatogênese e a meiose das células germinativas, enquanto a diferenciação da espermátide em espermatozoide é controlada pelo FSH.
- **Prolactina:** também é envolvida no mecanismo da espermatogênese regulando a liberação de gonadotrofinas e atuando sinergicamente com o LH, aumentando a esteroidogênese. Tem efeito estimulante na utilização da glicose e na atividade da adenilciclase e ATPase dos espermatozoides, influenciando a motilidade e a capacitação espermática por promover maior captação de cálcio pelos espermatozoides.

COLETA E PREPARO DA AMOSTRA

O exame normalmente é precedido de abstinência sexual de dois a sete dias e examina-se o produto de uma única ejaculação.

Deve ser registrado o nome da pessoa, o período de abstinência, data e hora da coleta, assim como o período de intervalo entre a coleta e o exame, e medicamentos em uso, dado este de extrema importância visto que pode influenciar sensivelmente na contagem dos espermatozoides.

A sala de coleta deve ser silenciosa e distante dos ruídos normais do laboratório, a fim de amenizar os efeitos inibitórios sobre o paciente. Instruir o paciente para evitar perda do material, principalmente o 1º jato, pois invalida a realização do exame.

O frasco deve ser esterilizado e, se possível, de plástico não espermicida. As mãos e o pênis devem ser lavados, e jejum alimentar não é requerido.

O ideal é que pelo menos duas amostras sejam coletadas para avaliação inicial. O intervalo entre as duas coletas dependerá das circunstâncias locais, mas não deve ser menor que sete dias ou maior que noventa dias. Se o resultado dessas duas análises for marcadamente discrepante, análises adicionais deverão ser realizadas, pois está presente na emissão do líquido seminal uma importante variação biológica.

A coleta domiciliar deve ser usada somente como alternativa em impedimentos físicos e/ou emocionais. Se a coleta não puder ser realizada no laboratório, a amostra deverá ser enviada dentro de 30 minutos após a coleta. Se testes funcionais para os espermatozoides tiverem de ser realizados, é crítico que os espermatozoides sejam separados do plasma seminal antes de passada uma hora da ejaculação.

ANÁLISE MANUAL DO SÊMEN

Físico-química

Volume

Em condições normais, varia entre 1,5 e 5 mL. Volumes inferiores a 1,5 mL configuram as hipospermias, enquanto a ausência de esperma é denominada aspermia. O volume varia ainda em um mesmo indivíduo, diminuindo com ejaculações repetidas em curto espaço de tempo e aumentando com a abstinência mais prolongada. É comum que se encontrem volumes seminais elevados em azoospérmicos, exceção feita àqueles que apresentam agenesia dos deferentes quando o volume é bastante reduzido, visto que, por ter a mesma origem embriológica, as vesículas seminais também não existem.

Viscosidade

Durante a pipetagem da amostra para a medição do volume, a sua consistência pode ser avaliada. A consistência (ou "viscosidade") da amostra liquefeita é considerada normal quando gotas são formadas ao retirar o líquido da pipeta. No caso de viscosidade anormal verifica-se no processo de gotejamento a formação de um filamento de cerca de 2 cm.

Cor

Normalmente o sêmen é cinza-claro, tornando-se translúcido após a liquefação. A presença de piócitos em grande quantidade confere ao esperma uma cor amarelada, enquanto a presença de hemácias, hemospermia, é sugestiva, em muitos casos, de infecção específica, conferindo a cor avermelhada.

Odor

O esperma recentemente emitido tem odor *sui generis*, que pode ser comparado ao da água sanitária; isto se deve a substâncias produzidas na próstata (espermina, espermidina e putrecina), de tal sorte que na atrofia prostática e nas prostatites esse odor característico pode faltar.

Reação (pH)

Deve ser determinada em um tempo padrão, não ultrapassando 1 hora após a ejaculação e deve variar de 7,2 a 8,0, devendo ser mantido em recipiente fechado, o que impede o escape de CO_2 para o meio ambiente. Em contato com o ar, o pH vai se elevando e atinge valores superiores a 8,0, invalidando a medida.

Liquefação

Uma amostra seminal normal liquefaz em até 30 minutos à temperatura ambiente. A presença de grumos mucosos, sinal de liquefação incompleta, pode interferir na contagem dos espermatozoides. Amostras seminais normais podem conter granulações gelatinoides (corpos gelatinosos), os quais não liquefazem. O significado desse fato é desconhecido.

A liquefação pode ser:

- **Primária:** o sêmen é totalmente liquefeito, imediatamente após a ejaculação, pela ausência ou insuficiência das vesículas seminais.
- **Parcial:** o sêmen é parcialmente liquefeito, imediatamente após a ejaculação, pela deficiência de espermolisinas.
- **Secundária:** liquefação normal, ocorrendo até 30 minutos após a ejaculação.

Coagulação

Imediatamente após a emissão, o esperma transforma-se em um gel através de um processo enzimático não bem definido. Adquire, então, um aspecto heterogêneo, formando-se coágulos, provavelmente para proteger os espermatozoides do contato com o conteúdo vaginal hostil. Em temperatura ambiente, o gel vai transformando-se em sol, num tempo que varia de 5 a 30 minutos da emissão. Esse segundo processo é comandado pela fibrinolisina, enzima contida na secreção prostática. As alterações no tempo de liquefação ou a própria ausência da liquefação são, portanto, devidas à disfunção prostática.

Microscópica

Morfologia do espermatozoide

A morfologia espermática constitui-se um parâmetro de extrema importância para avaliação da qualidade e viabilidade do espermatozoide.

Configura-se na avaliação da cabeça, peça intermediária e cauda do espermatozoide, o que deve obrigatoriamente ser realizado em esfregaço corado preferencialmente pelo Papanicolaou, podendo-se também usar colorações do tipo Romanovsky, por exemplo, Giemsa ou Wright.

O esfregaço deve ser preparado a partir de "papa de sêmen", centrifugando o material com salina estéril por três vezes na proporção de uma parte de sêmen para três partes de salina para posterior confecção da película.

A definição de um padrão que possa ser aceito como o de "normalidade" baseia-se na visualização das formas dos espermatozoides que interagiram com o muco cervical e a morfologia esperada, e que poderá ser atribuída como normal. Deve ser aquele espermatozoide que apresenta a cabeça com formato oval, com uma região acrossômica e bem-definida, compreendendo de 40% a 70% da área da cabeça do espermatozoide e não pode ser visto defeito anatômico na peça intermediária ou na cauda do espermatozoide.

A classificação da morfologia espermática é definida pela Organização Mundial da Saúde, sendo o manual da OMS 3ª edição (Morfologia convencional) ainda o mais usado nos espermogramas de rotina, e os manuais da 4ª e 5ª edições (Morfologia estrita ou Krueger) costumam ser mais usados por clínicas de infertilidade, por serem mais detalhados e direcionados para prognósticos de inseminação artificial.

Cada serviço deve definir a classificação morfológica usada, porém é de extrema importância que seja explicitado no laudo a referência utilizada. Sugere-se aos laboratórios que realizem o espermograma como triagem, que se utilizem da 3ª edição do manual da OMS, com isso adotando os critérios convencionais, e o serviço que seja referência para clínicas de infertilidade, utilize a 4ª ou 5ª edição onde adotará o critério estrito.

A morfologia convencional é um método de avaliação menos exigente, porém não menos importante, aceitando pequenos defeitos, como microvacúolos acrossômicos, variações discretas nas dimensões da cabeça, pequenas reentrâncias na peça intermediária, de tal modo que, quando a análise for realizada por profissionais experientes possa ser executada em aumento de quatrocentas vezes.

A morfologia estrita, por sua vez, também conhecida como Morfologia de Krueger, adota um critério rigoroso de classificação, em que devem ser contados de duzentos a quinhentos espermatozoides em aumento de mil vezes, de preferência que sejam mensurados com auxílio do micrômetro, sendo considerados normais quando a cabeça tenha comprimento de 5 a 6 μm e espessura de 2,5 a 3,5 μm, configuração oval, lisa, regular e com região acrossômica entre 40% e 70% da cabeça do espermatozoide. Ainda para ser considerado normal, não deve haver nenhum defeito na peça intermediária, como por exemplo restos citoplasmáticos, bem como não existir nenhuma angulação diferente de 180º entre cabeça e peça, e a cauda deve ser livre de qualquer atipia.

Ainda, na análise do esfregaço seminal corado, deve ser dispensada especial atenção na diferenciação das "células redondas" que encontramos na análise no sêmen a fresco, e que devem ser classificadas como elementos germinativos (geralmente espermatócitos e espermátides), leucócitos (geralmente neutrófilos e macrófagos), e glóbulos proteicos, componentes estes que, não raro, são confundidos na análise a fresco com elementos germinativos ou leucócitos, e que na lâmina corada são facilmente identificados.

Apesar de o manual da OMS não esclarecer claramente, na prática laboratorial observa-se que a presença de dois ou mais leucócitos por campo em aumento de quarenta vezes, sugere a presença de um processo inflamatório, que pode ser infeccioso ou não, e a presença de mais de cinco a dez células germinativas para cada cem espermatozoides contados pode configurar-se em um possível bloqueio de maturação espermática, muito comum, por exemplo, nos pacientes portadores de varicocele, que está presente em cerca de 50% a 70 % dos casos de infertilidade masculina.

Salienta-se que na prática laboratorial observa-se uma correlação entre a contagem das "células redondas" em câmara e no esfregaço corado, sendo que cada célula visualizada (elemento germinativo ou leucócito) em aumento de quarenta vezes equivale aproximadamente a 1.000.000/mL.

As Figuras 15.2 a 15.16 mostram espermatozoides normais, com alterações morfológicas, espermátides e leucócitos.

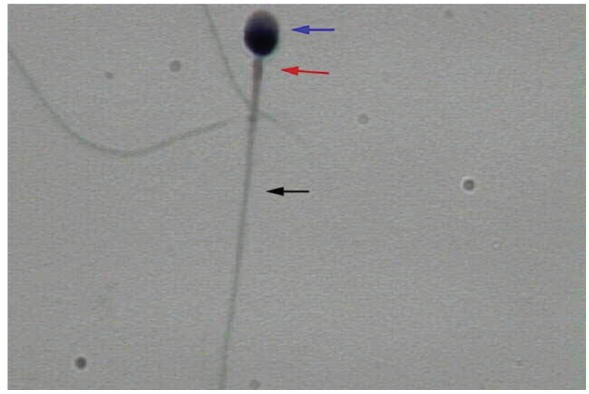


Figura 15.2 Espermatozoide normal. Seta azul indica cabeça oval em proporções normais. Seta vermelha aponta a peça intermediária. Seta preta indica cauda sem anormalidades.
Fonte: Acervo do autor.

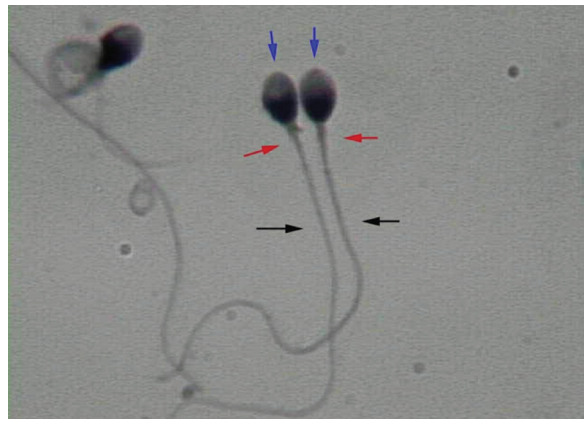


Figura 15.3 Espermatozoides normais. As setas azuis indicam cabeça oval em proporções normais. As setas vermelhas apontam para as peças intermediárias. As setas pretas indicam as caudas sem anormalidades.
Fonte: Acervo do autor.

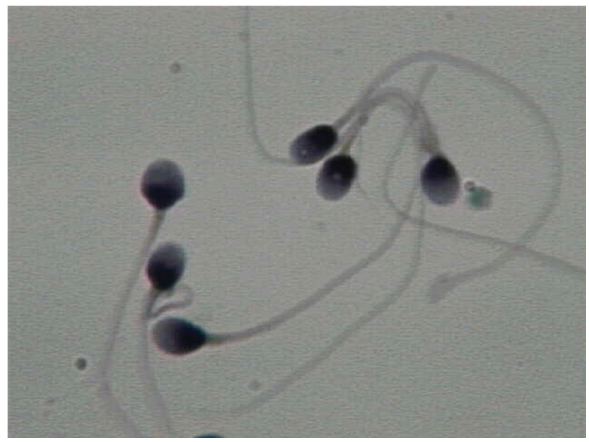


Figura 15.4 Espermatozoides normais.
Fonte: Acervo do autor.

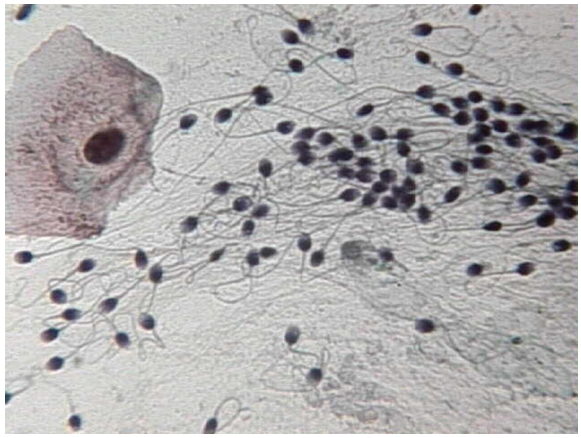


Figura 15.5 Espermatozoides normais no muco cervical.
Fonte: Acervo do autor.

Figura 15.8 Alterações de cabeça. As setas azuis apontam para vacúolos no acrossoma.
Fonte: Acervo do autor.

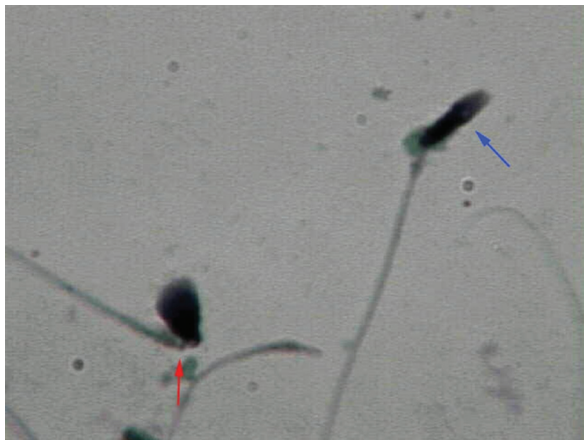


Figura 15.6 Alterações de cabeça. A seta vermelha aponta para uma cabeça angulada. A seta azul aponta para um espermatozoide com cabeça fina.
Fonte: Acervo do autor.

Figura 15.9 Alterações de peça intermediária. As setas vermelhas apontam para espermatozoides com angulação de peça intermediária.
Fonte: Acervo do autor.

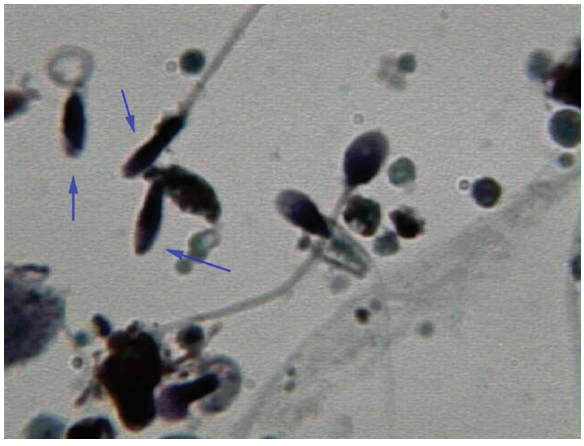


Figura 15.7 Alterações de cabeça. Cabeças em chama.
Fonte: Acervo do autor.

Figura 15.10 Gota citoplasmática.
Fonte: Acervo do autor.

Figura 15.11 Alterações de cauda. Caudas enroladas e cauda dobrada.
Fonte: Acervo do autor.

Figura 15.12 Alterações de cauda. Espermatozoide bicaudal.
Fonte: Acervo do autor.

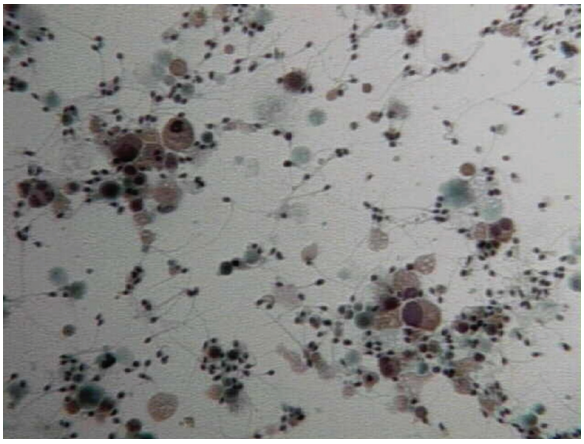


Figura 15.13 Evidência de bloqueio de maturação.
Fonte: Acervo do autor.

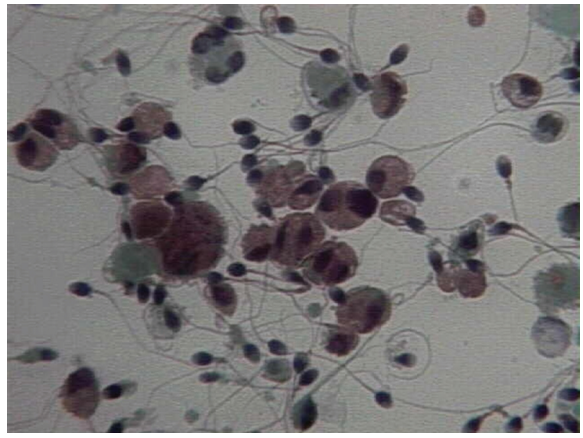


Figura 15.14 Evidência de bloqueio de maturação. Espermátides.
Fonte: Acervo do autor.

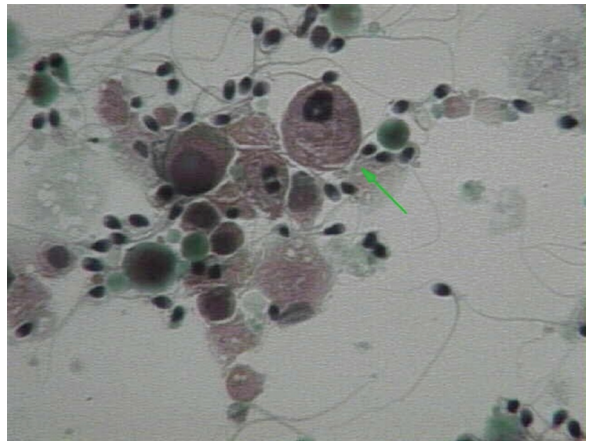


Figura 15.15 Células germinativas. A seta verde aponta para uma espermátide.
Fonte: Acervo do autor.

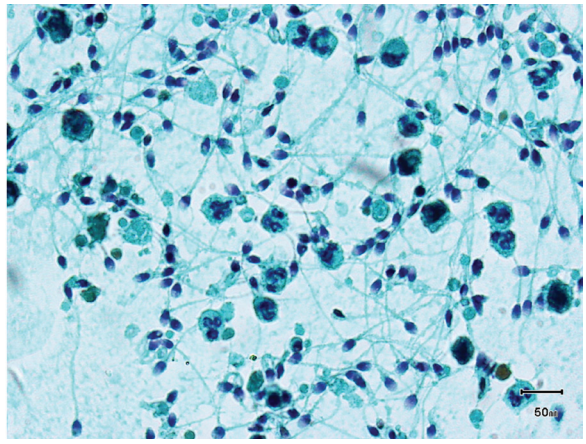


Figura 15.16 Processo inflamatório. Espermatozoides e leucócitos.
Fonte: Acervo do autor.

Concentração espermática

Igual ou maior a 15 milhões/mL do ejaculado.

Métodos de contagem

- Câmara de Neubauer: a diluição vai depender da concentração espermática, que deve ser verificada entre lâmina e lamínula. Se for observada alta concentração, deve-se diluir 1:40 a 1:50; se a concentração for mediana, diluir 1:20 a 1:30, e em baixas concentrações diluir 1:10; e em casos de visualização de 1 a 2 por campo, diluir 1:2. Deve-se utilizar o retículo de Thoma, contando os 4 quadrantes laterais e o central, multiplicando o número de espermatozoides obtido × diluição × 50.000 obtendo o resultado em milhões por mL. O líquido de diluição utilizado é solução salina a 0,5% em formol.
- Câmara de Makler: não utiliza diluição. A câmara deve ser preenchida de acordo com a técnica da mesma, normalmente 10 μL. Ler 10 quadrantes e multiplicar por 1.000.000, sendo o resultado expresso em milhões por mL. Em todos os métodos de contagem a correta homogeneização do material é crítica, sendo uma das principais fontes de erro desta técnica.

Graus de motilidade

A motilidade espermática, análise altamente subjetiva, idealmente deveria ser analisada em microscopia de fase, com câmaras específicas para analise do sêmen, por exemplo, a de Makler, mas em geral é realizada em microscopia ótica comum e entre lâmina e lamínula, o que aumenta ainda mais a subjetividade da análise. Para minimizar esta situação, deve-se sempre padronizar o tamanho da lamínula e a quantidade de esperma a ser utilizada, por exemplo, 20 μL de sêmen e lamínula 18×18 ou 20×20. A correta e adequada homogeneização do material é fator crítico, bem como o tempo de análise após a montagem da lâmina com o sêmen a fresco, que não deve passar de 45 a 60 segundos. Outra situação que muitas vezes passa despercebida é a temperatura em que o sêmen fica armazenado até a análise. Esta nunca deve ser superior a 37 °C e nem inferior a 20 °C, podendo utilizar-se de banho-maria ou estufa quando a temperatura ambiente estiver fora desses valores. O tempo máximo para avaliação da motilidade é de 60 minutos após a coleta. O ideal é que a análise seja feita em duplicata, analisando pelo menos 10 campos em aumento de 400 vezes. Caso haja discrepância entre as análises, superior a 10%, uma terceira lâmina deve ser montada.

Com a publicação da 5ª edição do manual da OMS, ocorreram mudanças na avaliação da motilidade espermática. Os espermatozóides progressivos são classificados em conjunto com uma referência única e não mais separados em progressivos, rápidos, e lentos.

Portanto, o laboratório deve classificar os espermatozoides móveis em porcentagem, dividindo-os em progressivos (espermatozoide corta o campo microscópico sem mudar de direção, de forma rápida ou lenta), não progressivos (direção indefinida, errático, *in situ*) e imóveis.

É importante ressaltar que deve haver treinamento e padronização de todos os profissionais de um mesmo laboratório que fazem análise da motilidade espermática para evitar que a variação entre os examinadores não seja superior a 10%.

Viabilidade ou vitalidade espermática

A análise da viabilidade ou vitalidade espermática utiliza um corante tipo exclusão nuclear para determinar se os espermatozoides imóveis estão vivos, mas incapazes de se mover, ou realmente mortos (necrospermia). O teste de vitalidade utiliza uma coloração muito simples, na qual se usa a eosina como corante e a nigrosina como contracorante. Espermatozoides que não deixam passar o corante estão vivos, e os que coram a cabeça de vermelho estão mortos. Ambos podem ser facilmente visualizados contra o fundo escuro criado pela nigrosina.

Pode-se realizar o teste da vitalidade somente com a eosina, o que requer do examinador mais experiência, necessitando trabalhar o diafragma do microscópio a fim de produzir um jogo de luz para melhor visualização. O resultado é reportado em porcentagem de espermatozoides vivos e mortos.

Bioquímica

Apesar da pouca utilização na prática laboratorial, as dosagens bioquímicas podem fornecer informações importantes na investigação das causas de infertilidade e são recomendadas pela OMS. Existem marcadores para cada glândula componente do aparelho genital masculino. São elas:

- **Glândula prostática:** ácido cítrico, inositol, zinco, g-glutamil transpeptidase, fosfatase ácida, zinco, cálcio, magnésio.
- **Vesículas seminais:** frutose, prostaglandinas e ácido ascórbico.
- **Epidídimos:** L-carnitina livre, glicerilfosforilcolina e alfaglucosidase neutra.

Uma função secretora diminuída reflete-se em baixa emissão de marcadores específicos, o que pode ser utilizado na análise da função secretora da glândula acessória.

Para todas as dosagens bioquímicas é importante que uma alíquota do esperma seja retirada imediatamente após a liquefação do sêmen, centrifugada, separando-se o plasma seminal para evitar resultados falsamente diminuídos em função do consumo pelos espermatozoides.

A dosagem bioquímica mais importante no esperma é a Frutose. Se nenhum espermatozoide for observado, e não se tratar de controle pós-vasectomia, um teste quantitativo para a detecção de frutose deve ser efetuado. A frutose é uma substância androgênica-dependente e é produzida nas vesículas seminais. A maior parte dos estudos sobre frutose usa o método de resorcinol. Ela pode ser dosada pelo método espectrofotométrico de Roe. Níveis baixos de frutose geralmente indicam deficiência na atividade secretora das vesículas seminais, exceto em sêmens polizoospérmicos, isto é, aqueles com densidade espermática maior que 250 milhões de esper-

matozoides/mL. A ausência de frutose e um volume baixo de ejaculado, associado à incapacidade do sêmen de coagular sugere a ausência congênita do vaso deferente e das vesículas seminais ou a obstrução dos ductos ejaculatórios. Valores elevados são raros e de significado clínico pouco conhecido.

Alguns autores preconizam que o teste de frutose pode ser somente qualitativo, o que seria suficiente para definir o marcador da vesícula seminal.

Imunológica

Entre 2% e 20% dos homens inférteis apresentam anticorpos séricos aglutinantes e imobilizantes de espermatozoide, e muitos deles também apresentam esses elementos no plasma seminal. A presença de autoanticorpos no plasma seminal imobiliza os espermatozoides e reduz sua capacidade de penetração no muco cervical. Além disso, favorece a autoaglutinação espontânea do esperma por anticorpos aglutinantes.

A presença de anticorpos antiespermáticos revestindo os espermatozoides é típica e pode ser considerada específica no caso da infertilidade imunológica. Os anticorpos espermáticos no sêmen pertencem quase exclusivamente a duas classes imunológicas: IgA e IgG. Os anticorpos IgA têm maior importância clínica que os anticorpos IgG. Os anticorpos IgM, por causa do seu grande tamanho molecular, são raramente encontrados no sêmen.

Os testes de triagem para anticorpos no plasma seminal são realizados em amostras seminais frescas e se utilizam dos métodos de *Immunobead* e da reação mista da antiglobulina (*MAR test*).

Os resultados do *Immunobead* e do *teste Mar* nem sempre estão em concordância. O *Immunobead* correlaciona-se bem com os testes de aglutinação e imobilização espermática realizados no soro. Quando estes são positivos, outros testes (do contato esperma-muco cervical, esperma-muco cervical no tubo capilar ou titulação de anticorpos espermáticos no soro) irão convalidar e confirmar o diagnóstico.

Testes para detecção de anticorpos antiespermatozoides no esperma

Mar test (Reação mista antiglobulina)

Direto IgG e IgA. O paciente deve estar em abstinência sexual de dois a sete dias, o material deve ser colhido por automasturbação, e o teste deverá ser realizado em até 4 horas após a coleta. Em uma lâmina de microscopia colocar:

- 10 μL de partículas de látex revestidas com IgG ou hemácias de carneiro revestidas de IgG.
- 10 μL de sêmen fresco.
- Misturar com espátula.
- Adicionar 10 μL de soro anti-IgG diluído a 1/20 em Ringer Frutose.
- Misturar.
- Cobrir com lamínula e observar em microscopia de fase logo após a preparação, e novamente após 10 minutos.
- Contar 100 espermatozoides móveis.

Na ausência de autoanticorpos sobre os espermatozoides, estes serão vistos nadando livremente entre as partículas de látex, as quais irão aderir entre si, provando a efetividade da preparação.

Quando positivo, na presença de autoanticorpos, serão observados mais de 10% de espermatozoides móveis, com partículas de látex aderidas a eles. Na primeira leitura observam-se poucas partículas aderidas aos espermatozoides e, posteriormente, podem formar aglutinações tão compactas que haverá formação de blocos grandes ou bloco único.

Teste Immunobead

Os anticorpos presentes na superfície da célula espermática podem ser detectados pelo teste *Immunobead*. *Immunobeads* são esferas de poliacrilamida com imunoglobulinas anti-humanas de coelho aderidas por covalência. A presença de anticorpos IgG, IgA e IgM pode ser simultaneamente determinada por este teste.

Os espermatozoides são preparados livres do plasma seminal (lavados) por centrifugações repetidas e ressuspensão em meio tampão. A suspensão de espermatozoides é homogeneizada e misturada com a suspensão de *Immunobeads*. Essa preparação é examinada a uma magnificação de 400× em microscopia de contraste de fase. Enquanto os espermatozoides nadam através da suspensão, os *Immunobeads* vão aderindo aos móveis, que têm anticorpos aderidos à superfície. Determina-se a proporção de espermatozoides com anticorpos de superfície e a classe (IgG, IgA ou IgM) desses anticorpos pode ser identificada utilizando-se diferentes categorias de *Immunobeads*. O teste é considerado positivo quando 20% ou mais dos espermatozoides se apresentam com *Immunobeads* aderidos. No entanto, a penetração espermática no muco cervical e a fertilização *in vitro* tendem a não ser significantemente prejudicadas a menos de 50% ou mais dos espermatozoides móveis que tenham anticorpos aderidos.

- Para esta técnica de detecção de anticorpos antiespermatozoides são utilizadas microesferas adicionadas de anti-IgG, IgA e IgM, e tampão fosfato (PBS).
- Para cada tipo de anticorpo (IgG, IgA ou IgM) adicionar 200 μL de suspensão de microesferas em tubos de centrifugação.
- Adicionar a outro tubo de centrífuga 800 μl de sêmen fresco e completar para 10 mL com tampão fosfato (PBS).
- Centrifugar a 2.000 rpm por 10 minutos.
- Decantar e desprezar o sobrenadante.
- Colocar 10 μL de cada tipo de microesfera misturados a 10 μL de suspensão de espermatozoides lavados em uma lâmina de microscopia, cobrindo com lamínula 20 × 20.
- Deixar por 5 minutos em câmara úmida.
- Observar ao microscópio (aumento 400×) conferindo a porcentagem de espermatozoides aderidos às diferentes microesferas, registrando a classe a que pertencerem.

Anticorpos antiespermatozoides séricos

Em pacientes com nenhuma evidência endócrina, sêmen ou outra anormalidade, o título de anticorpos antiespermatozoides pode ser mencionado.

Os anticorpos antiespermatozoides são um achado comum após vasectomia, ocorrendo em aproximadamente 50% dos casos.

A incidência e o significado de anticorpos antiespermáticos séricos em casais com problemas de infertilidade são controversos.

Em homens, um relato sugere que título de anticorpos é mais significante que a mera detecção do anticorpo. Altos títulos em homens são considerados de grande evidência contra fertilidade. Baixos títulos têm significado incerto, e títulos intermediários indicam uma insuficiência, mas não inutilidade de prognóstico.

Em mulheres, anticorpos antiespermatozoides estão presentes em 7% a 17% dos casos de infertilidade, mas seu significado é incerto, desde que uma porcentagem considerável dessas mulheres possa vir a engravidar. A detecção de anticorpo antiespermático no muco cervical de mulheres é provavelmente muito mais importante que sua detecção sérica.

Microbiológica

Precauções especiais devem ser tomadas para evitar contaminação durante a coleta do sêmen para cultura. Antes da obtenção da amostra, o indivíduo deve urinar. Imediatamente depois disso, o paciente deve lavar as mãos e o pênis com sabão. Todo o sabão deve ser removido com água, e o local seco com uma toalha limpa. O frasco para coleta deve estar esterilizado. A cultura do plasma seminal para verificar a presença de microrganismos tanto aeróbicos quanto anaeróbicos pode ajudar no diagnóstico da infecção de glândula acessória, particularmente da próstata.

Os valores de referência não estão bem definido, mas é importante que a cultura seja analisada em conjunto com a evidência de processo inflamatório.

Se o esperma possui processo inflamatório, qualquer crescimento bacteriano deverá ser considerado. Se o esperma não possui processo inflamatório, mas obteve-se um crescimento superior a 5.000 UFC/mL deve-se proceder à identificação bacteriana. Até 5.000 UFC/mL, sem a presença de processo inflamatório, deve-se proceder à identificação somente se o crescimento bacteriano for uniforme.

Como o líquido seminal contém substâncias bactericidas, tem-se percebido na prática que a diluição prévia do sêmen em salina estéril tem aumentado a sensibilidade das culturas, permitindo melhor isolamento e quantificação das colônias.

Atenção especial deve ser dada aos *Mycoplasmas,* sendo eles *Ureaplasma urealyticum, Mycoplasmas hominis, Mycoplasmas fermentans e Mycoplasmas genitalium,* bem como para a *Chlamydia,* cujo método de escolha deve ser a captura híbrida ou PCR.

Exames complementares

SWIM-UP

Teste baseado na capacidade de nadar para cima (*swin-up*) de espermatozoides móveis no sêmen, onde o meio de cultura sugerido é o meio de Earle suplementado.

- Adicionar delicadamente 1,2 mL de meio de Earle suplementado a 1 mL de sêmen em tubo de centrífuga estéril de 15 mL.
- Inclinar o tubo a 45º e incubar por 1 hora a 37 ºC.
- Recolocar o tubo na posição vertical e remover 1 mL do sobrenadante.
- Diluir a alíquota recolhida a 1/8 com meio de Earle suplementado.
- Centrifugar a 2.000 rpm por 5 minutos.
- Desprezar o sobrenadante e ressuspender com 0,5 mL de meio de Earle.

Os espermatozoides obtidos nessa última fração estão livres do plasma seminal e de detritos celulares, e a grande maioria tem boa motilidade, podendo então ser usados em inseminação artificial.

No indivíduo normal ocorre a recuperação de, no mínimo, 10% de concentração inicial com melhoria da motilidade.

Avaliação da região acrossômica

Teste realizado após o *Swin-up,* em que serão utilizados corantes supravitais de *Tripan blue*, Rosa bengala e Marrom Bismarck, todos em solução aquosa a 0,5%.

Os resultados são avaliados em quatro categorias:

- **Vivos não reativos:** região acrossômica rosa e pós-acrossômica marrom.
- **Vivos reativos:** região acrossômica não corada e região pós-acrossômica marrom.
- **Mortos reativos:** região acrossômica não corada e pós-acrossômica corada de azul-escuro a negro.
- **Mortos não reativos:** região acrossômica levemente rosa, e região pós- acrossômica azul-escuro a negro.

Teste hipo-osmótico

Oferece informação adicional sobre a integridade e a funcionalidade da membrana celular da cauda do espermatozoide. Há uma relação estreita entre positividade do teste Hipo-osmótico, que é uma expansão do volume celular, com a capacidade de penetração de espermatozoides na zona pelúcida de óvulos de hamster. Utiliza-se de solução de Ringer Frutose.

- Adicionar 1mL da solução de Ringer Frutose e 0,1mL do sêmen e homogeneizar delicadamente.
- Deixar 35 minutos em BM.
- Observar em lâmina-lamínula em microscopia de fase em 400×.
- Contar 100 espermatozoides, com e sem edema, separadamente.
- Espera-se número maior ou igual a 60% de espermatozoides com edema de cauda.

Tem-se utilizado Teste de Avaliação da Integridade do DNA Espermático com Acridina Orange, integridade esta essencial para a transmissão genética. Outro teste bem atual é

a pesquisa de microdeleções no Cromossoma Y em pacientes com azoospermia não obstrutiva.

ANÁLISE AUTOMATIZADA

Uma análise padronizada, acurada e precisa da motilidade dos espermatozoides no sêmen irá melhorar o prognóstico, e possivelmente o poder de diagnóstico do laboratório. A tecnologia de vídeo e visão computadorizada produziu novos instrumentos capazes de identificar e acompanhar o traçado individual das células espermáticas, e daí calcular uma série de parâmetros que caracterizam a cinemática (isto é, a geometria dependente do tempo) da movimentação do espermatozoide. Tais instrumentos usam um computador para processar o sinal elétrico obtido por uma videocâmara integrada a um microscópio, tanto pela análise direta do sinal quanto pela análise do sinal correspondente emitido por um gravador de vídeo. Quando utilizada com propriedade, a metodologia CASA oferece uma refinada precisão na análise da concentração e motilidade espermática em comparação com a determinação visual subjetiva. Isso permite concordância nas determinações realizadas em uma série de diferentes laboratórios.

Não há dúvida de que a automação do espermograma aumenta bastante a qualidade das análises, mas o laboratório deve estabelecer uma relação custo-benefício antes de implantar a automação, devendo avaliar a quantidade de exames realizada diariamente e o tempo do profissional dedicado à realização dos exames.

PÓS-VASECTOMIA

A análise do sêmen dos pacientes vasectomizados, apesar da aparente simplicidade, requer do analista alguns cuidados para que o resultado final seja fidedigno com a condição atual do indivíduo, e trabalhos indicam que 1 em cada 2.000 pacientes vasectomizados por alguma forma de recanalização ou falência da vasectomia acabam por engravidar a mulher.

Um dos principais problemas é a falta de padronização de quando realizar o exame pós-vasectomia e se este precisa ser temporariamente repetido para confirmação da azoospermia.

O Manual da OMS é econômico em abordar o controle pós-vasectomia, porém a Associação Americana de Urologia elaborou diretrizes robustas que são amparadas por vários trabalhos e que definiram apesar de algumas lacunas a abordagem ao paciente pós-vasectomizado.

Na prática clínica observa-se que os pacientes são muitas vezes orientados a realizar o controle de 45 a 60 dias após a cirurgia, o que se mostra uma orientação equivocada, pois a ampola seminal estrutura anexa à vesícula seminal, que se localiza acima do canal deferente, na maioria das vezes ainda mantém espermatozoides, que apesar da baixa viabilidade espermática, podem ser ejaculados normalmente.

A definição de eficácia contraceptiva é a ausência de gravidez, enquanto a eficácia oclusiva é a azoospermia.

Ocorre que alguns pacientes não conseguem atingir azoospermia depois da vasectomia, mas também não chegam a engravidar a parceira. Estudos mostraram que percentual importante dos homens permanecem com espermatozoides no ejaculado pós-vasectomia até 10 anos após a cirurgia, mas nenhum deles engravidou a mulher. Por este motivo a diretriz americana considerou também como eficácia oclusiva homens que revelam presença de menos de 100.000 mil espermatozoides por mL de sêmen, desde que imóveis ou mortos.

Portanto, pelas diretrizes americanas somente é considerada falha a vasectomia que não conseguir atingir a azoospermia ou a concentração inferior a 100.000 espermatozoides por mL de sêmen (imóveis ou mortos) após um período médio de 06 meses após a realização da cirurgia. Neste contexto, pacientes que permanecem com espermatozoides móveis após 06 meses deve ser considerado a revasectomia, e pacientes com concentrações superiores a 100.000/mL imóveis, deve ser avaliado caso a caso com o cirurgião a necessidade ou não de revasectomia.

A evidência de um único espermatozoide móvel no ejaculado do pós vasectomizado depois de 6 meses indica falência da vasectomia, que pode ter ocorrido por erro na oclusão cirúrgica ou recanalização do canal deferente.

A recanalização deve ser suspeitada quando após um espermograma pós-vasectomia com azoospermia, for detectado a presença de espermatozoides móveis ou aumento do número de espermatozoides imóveis em relação a amostras anteriores.

Ainda, a recanalização é considerada precoce quando o paciente não atinge em nenhum momento a azoospermia ou concentração menor que 100.000/mL, e tardia quando tal situação ocorre depois da constatação de azoospermia.

Uma situação ainda controversa, é o tempo e frequência após a vasectomia em que o paciente deve realizar o exame.

Tanto a OMS quanto as diretrizes evidenciam que existe grandes variações individuais, e que tal situação vai depender da técnica cirúrgica, da anatomia da ampola seminal e vesícula seminal, e idade do paciente.

Na grande maioria dos homens após 20 ejaculações e três meses após a vasectomia, obtém-se a azoospermia, sendo o que se tem recomendado atualmente, mas um número significativo de homens ainda permanecem com espermatozoides residuais por tempo indeterminado.

Uma outra controvérsia é a técnica utilizada pelos laboratórios na análise do sêmen pós-vasectomia, enquanto alguns são rigorosos demais, incluindo centrifugação do material e análise de centenas de campos, outros se limitam a análise de poucos campos com o esperma bruto.

Tanto a OMS quanto as diretrizes não recomendam a centrifugação imediata do sêmen, pois a pesquisa de espermatozoides móveis pode ficar prejudicada, e esta é extremamente importante para o diagnóstico de possível falência ou recanalização da vasectomia.

Diante dessas informações recomenda-se não ultrapassar a 120 minutos para a análise do sêmen do pós-vasectomizado, pesquisar exaustivamente a presença de espermatozoide móvel e relatar a presença de espermatozoides em concentração inferior a 100.000/mL imóveis/mortos na amostra bruta, o que é facilmente demonstrado quando nenhum esperma-

tozoide é observado nas áreas de contagem das câmaras de profundidade, mas evidenciado fora dela, ou quando a análise é realizada entre lâmina e lamínula, e são visualizados espermatozoides somente após percorrer entre 30 a 50 campos de aumento 40 vezes.

Ressalta-se que quando for possível determinar a concentração espermática, esta deve ser relatada no laudo.

Em função da ausência dos espermatozoides e elementos germinativos, é comum observarmos no vasectomizado, células da vesícula seminal, próstata e uretra, bem como a presença de neutrófilos, o que pós vasectomia pode ser considerado normal, devendo ser relatado para que seja estabelecida correlação clínico-patológica.

Recomenda-se que o paciente vasectomizado confirme o status de azoospermia a cada seis a doze meses, pelo menos por dois a três anos após a cirurgia, em função da possibilidade de recanalização tardia.

Como prevenção de complicações médico-legais deve-se inserir no laudo de pós-vasectomizados a seguinte expressão:

> "Este resultado refere-se exclusivamente a amostra analisada."
>
> "Somente seu médico tem condições de interpretar este resultado e analisar a necessidade de exames complementares."
>
> "Deve o paciente estar ciente que as Vasectomias podem ser reversíveis espontaneamente, por processos de recanalizações e outros tipos de falências."

NOMENCLATURAS

- Normozoospermia: concentração espermática dentro da normalidade.
- Acima de 15 milhões/mL de ejaculado.
- Oligozoospermia leve: 10 a 15 milhões de espermatozoides/mL.
- Oligozoospermia moderada: 5 a 10 milhões/mL.
- Oligozoospermia acentuada: menor que 5 milhões/mL.
- Criptozoospermia: menor que 1 milhão/mL.
- Polizoospermia: valores superiores a 250 milhões/mL.
- Azoospermia: ausência total de espermatozoides no ejaculado total, podendo ser observadas células germinativas.
- Astenozoospemia: menor que 32% dos espermatozoides com movimentos progressivos.
- Necrozoospermia: maior que 58% de espermatozoides mortos.
- Teratozoospermia: grande formação de espermatozoides em formato anormal.
- Hiperespermia: volume do ejaculado maior que 5,0 mL.
- Hipospermia: volume do ejaculado inferior a 1,5 mL.
- Aspermia: ausência total de ejaculado.
- Azoocitospermia: ausência total de espermatozoides e células germinativas.
- Presença de abundante quantidade de hemácias.
- Piospermia: maior que 1 milhão de piócitos/mL ou acima de dois por campo em aumento de 40 vezes.
- Aglutinação: quando ocorre em mais de 10% dos espermatozoides.
- Alterações de plasma seminal: aumento da viscosidade, liquefação, alterações de pH, presença de corpos gelatinosos.
- Ejaculação retrógrada: ejaculação para dentro da bexiga.

VALORES DE REFERÊNCIA

Valores de referência em Infertilidade Masculina com base no Manual de Referência da OMS (3ª, 4ª e 5ª edições)

Características físico-químicas do líquido seminal

- Volume: 1,5 a 5 mL.
- Odor: semelhante a odor de água sanitária (hipoclorito de sódio).
- Cor: branco opalescente.
- Coagulação: imediata e/ou completa.
- Liquefação: até 30 minutos.
- pH: 7,2 a 8,0.

Vitalidade espermática

- Espermatozoides móveis: maior ou igual a 40%.
- Espermatozoides vivos: maior ou igual a 58%.

Motilidade espermática

Soma dos progressivos rápidos + progressivos lentos: maior ou igual a 32%.

Concentração espermática

Maior ou igual a 15 milhões/mL.

Citologia espermática

- Elementos germinativos: até 5 milhões/mL ou 10% em relação ao total de espermatozoides.
- Espermatogônia: ausentes.
- Espermatócito primário: ausentes.
- Espermatócito secundário: até 5%.
- Espermátides: até 5%.
- Elementos vesiculares: raros.
- Elementos prostáticos: raros.
- Elementos uretrais: raros.
- Elementos inflamatórios:
  - Granulócitos: até 2 por campo (× 40) ou 1 milhão/mL.
  - Macrófagos: raros.

Morfologia Espermática Convencional OMS 3ª Edição (Papanicolaou)

Espermatozodes típicos (normais): maior ou igual a 30%.

Morfologia Espermática Estrita (Papanicolaou) – 4ª Edição

Presença de no mínimo 14% de espermatozoides típicos, sem nenhuma alteração mínima que seja em cabeça (acrossoma, núcleo), peça intermediária e cauda.

Morfologia Espermática Estrita (Papanicolaou) – 5ª Edição

Presença de no mínimo 4% de espermatozoides típicos, sem nenhuma alteração mínima que seja em cabeça (acrossoma, núcleo), peça intermediária e cauda.

Testes de Capacitação Espermática

Swin-up: Recuperação de, no mínimo, 10% de concentração inicial com melhoria da motilidade.

Testes Bioquímicos (realizados no plasma seminal)

- Ácido cítrico: 300 a 800 mg/dL
- Frutose: 100 a 350 mg/dL
- Fosfatase ácida prostática: 10-30 mg/dL
- Zinco: 100 a 200 μg/dL

Perfil Hormonal Andrológico (soro e/ou plasma sanguíneo)

- FSH: 1,5 a 14,0 mUI/mL.
- LH: 1,4 a 7,7 mUI/mL.
- Testosterona: 286 a 1.511 ng/dL.
- Testosterona livre: 12 a 55 pg/mL.
- Prolactina: 2,5 a 17,0 ng/mL.
- Método utilizado: Quimioluminescência.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Adelman MM, Cahill EM. Atlas of Sperm Morphology. 1.ed. Chicago: ASCP Press, 1989.
2. Galba ESM. Espermocitograma. 1.ed. Porto Alegre: Ed Médica, 1994.
3. Henry JB. Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais. 19.ed. São Paulo: Manole, 2008.
4. Krueger TF, Lacquet FA, Sarmiento CAS, et al. A prospective study on the predictive value of normal sperm morphology evaluated by computer (IVOS). Fertil Steril. 1996;66(2):285-91.
5. Manual de Laboratório para o Exame do Sêmen Humano. 3.ed. OMS, 1992.
6. Neves PA, Rodrigues NN Jr. Infertilidade Masculina. 1.ed. São Paulo: Atheneu, 2002.
7. Neves PA, Sampaio F, Vanucci E. Espermograma – I Consenso Brasileiro sobre Infertilidade Masculina. São Paulo: Atheneu, 2000.
8. Pereira OS, Janini JBM. Atlas de Morfologia Espermática. 1.ed. São Paulo: Atheneu, 2001.
9. Piva S. Espermograma. 1.ed. Maringá: Laboratório São Camilo, 2001.
10. Vasectomy: AUA Guideline 2015 - Ira D. Sharlip, Arnold M. Belker, Stanton Honig, Michel Labrecque, Joel L. Marmar, Lawrence S. Ross, Jay I. Sandlow, David C. Sokal
11. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 4.ed. OMS, 1999.
12. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5.ed. OMS, 2010.

16

capítulo

Sérgio Luiz Bach

Líquido Sinovial

INTRODUÇÃO

As articulações sinoviais, também chamadas de diartroses, por possuírem uma característica de mobilidade, incluem a maioria das articulações do corpo. Apresentam uma superfície óssea recoberta por cartilagem articular; o espaço articular é delimitado pela cápsula articular fibrosa, e internamente pela membrana sinovial. Preenchendo todo o espaço interno da articulação ou especificamente da cavidade articular está o líquido sinovial.

O líquido sinovial é um ultrafiltrado plasmático proveniente dos capilares subsinoviais, e da ação secretora das células da membrana sinovial, que produzem um líquido contendo mucina e ácido hialurônico com a função de lubrificar e nutrir a cavidade articular. As artropatias causam, de maneira geral, uma redução da capacidade funcional das articulações, que podem evoluir para um processo degenerativo grave. A análise do líquido sinovial (LS) é uma importante ferramenta no diagnóstico e prognóstico das várias artropatias que podem acometer a cavidade articular, e vai muito além do simples efeito descompressivo que a artrocentese proporciona, embora muitos profissionais ainda acreditem na pouca informação que a análise do LS contribui na etiologia do derrame articular.

ANATOMIA DA CAVIDADE ARTICULAR E COMPOSIÇÃO DO LÍQUIDO SINOVIAL

Os aspectos básicos da cartilagem articular normal devem ser conhecidos para entendermos melhor a formação e a função do líquido sinovial (LS) e a importância do seu estudo em algumas patologias que acometem a cavidade articular. Nas articulações sinoviais (diartroses), as extremidades ósseas são recobertas pela cartilagem articular/hialina, cuja espessura se altera com a idade (diminui com o envelhecimento) e varia de acordo com o tamanho da articulação, variando de 1 a 7 mm, segundo a sua localização. Tem pelo menos duas funções fundamentais: permitir e orientar o deslizamento suave dos movimentos articulares e suportar cargas, dissipando energia. Não apresenta terminações nervosas, vasos sanguíneos ou linfáticos. É um tecido conjuntivo formado por células denominadas condrócitos, e por uma matriz de colágeno. Os condrócitos, única célula da cartilagem, são responsáveis pela manutenção e regulação funcional e estrutural da cartilagem, pois sintetizam os principais elementos da matriz. Na cartilagem hialina as fibras colágenas são responsáveis por cerca de 60% do peso da cartilagem desidratada. Destas fibras, 95% são colágeno tipo II, 3% do tipo XI, e 1% do tipo IX, que se distribuem por toda a cartilagem. A Figura 16.1 ilustra a anatomia da cavidade articular.

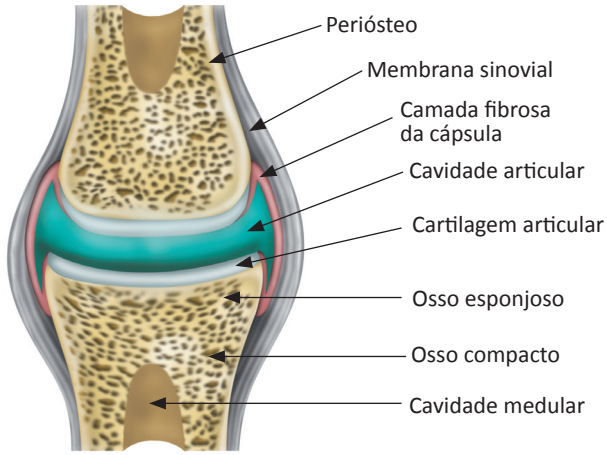


Figura 16.1 Representação de articulação.
Fonte: Adaptada de Mundt LA, *et al*., 2011.

A cavidade articular é delimitada pela parede da cápsula articular composta de tecido fibroso. Internamente, a cápsula articular é revestida pela membrana sinovial, separada da cartilagem hialina apenas pelo líquido sinovial. Esta membrana é composta de um folheto duplo onde a membrana mais externa, formada por tecido conjuntivo frouxo e pequenos capilares, se localiza entre a parede da cápsula articular/fibrosa e a membrana interna, denominada íntima sinovial. Esse folheto interno é formado por uma a quatro camadas de células, os sinoviócitos. De grande interesse, a íntima sinovial é composta por dois tipos morfologicamente distintos de sinoviócitos:

células do tipo A (linhagem proveniente de macrófagos) e células do tipo B (linhagem de fibroblastos). Os sinoviócitos do tipo A têm função absortiva, podem absorver e degradar substâncias extracelulares, debris celulares, microrganismos e antígenos no LS e na matriz cartilaginosa. Os sinoviócitos do tipo B fazem secreção de colágeno, fibronectina, hialuronato e outros proteoglicanos para o interior da cavidade articular. Essa membrana tem a capacidade de realizar a produção do LS através de um processo de ultrafiltração do plasma a partir dos capilares subsinoviais, devido à discreta diferença de pressão hidrostática e coloidosmótica desses capilares em relação à cavidade articular, o que permite que a água do compartimento intravascular se desloque em direção à cavidade articular passando pelas células da membrana da íntima sinovial. Esse processo de formação do líquido sinovial está extremamente equilibrado com o processo de reabsorção pelos vasos linfáticos sinoviais e também pelos capilares subsinoviais, equilíbrio que se altera nos processos patológicos, principalmente no processo inflamatório, onde o volume de líquido na cavidade aumenta de maneira considerável.

Então, podemos definir que o líquido sinovial é um ultrafiltrado do plasma, que penetra na cavidade articular através de fenestras do endotélio capilar subsinovial. As células da membrana sinovial (sinoviócitos) secretam um concentrado de mucopolissacarídeo (ácido hialurônico/hialuronato), o que contribui para a viscosidade do líquido. O líquido sinovial apresenta uma concentração de glicose, ácido úrico e eletrólitos semelhante à do plasma devido a uma baixa seletividade da barreira da membrana sinovial a estas substâncias. Já para as proteínas de alto peso molecular, a barreira apresenta uma restrição de passagem uma vez que no líquido sinovial encontramos em média 1/3 do valor plasmático. O predomínio proteico é de albumina, com ausência de fibrinogênio. De aspecto amarelo-claro, límpido, viscoso, estéril e incoagulável, esse líquido tem como função primordial lubrificar e também levar nutrientes para todas as células da cavidade articular. Os valores de referência para os componentes do líquido sinovial em adultos normais estão na Tabela 16.1.

Tabela 16.1 Valores de referência de líquido sinovial para adultos normais.

Leucócitos	< 150/μL
• Neutrófilos	< 25%
• Linfócitos	< 15%
• Monócitos	< 70%
Glicose (≠ entre sangue e LS)	< 10 mg/dL
Lactato	< 25 mg/dL
Proteínas	1-3 g/dL
Ácido úrico	< 8 mg/dL

Fonte: Adaptada Strasinger SK, *et al*., 2008.

Por meio da análise do líquido sinovial, as desordens da cavidade articular podem ser divididas em cinco categorias: Grupo I - Não inflamatório; Grupo II - Inflamatório; Grupo III - Séptico/Infeccioso; Grupo IV - Induzido por cristais; e Grupo V - Hemorrágico. A Tabela 16.2 traz somente algumas das principais patologias agrupadas nesses critérios, tendo em vista o grande número de doenças que, de maneira direta ou indireta, acometem a cavidade articular.

Tabela 16.2 Classificação em grupos das principais artropatias.

Grupo I Não inflamatório	Osteoartrite
	Artrite traumática
	Acromegalia
Grupo II Inflamatório	Artrite reumatoide
	Lúpus eritematoso sistêmico
	Febre reumática
	Artrite psoríase
	Síndrome de Reiter
	Colite ulcerativa
Grupo III: Séptico/infeccioso	Artrite séptica (bactérias, fungos, *Mycobacterium*, vírus...)
Grupo IV Induzido por cristais	Gota
	Pseudogota (condrocalcinose)
Grupo V Hemorrágico	Artrite traumática
	Distúrbios de coagulação (Hemofilia)
	Hemangioma

Fonte: Adaptada de Kjeldsberg C, *et al*., 1992.

Qualquer alteração na função do LS, devido à idade ou a um mecanismo patológico, pode contribuir no desenvolvimento de doenças degenerativas nas articulações, como a osteoartrite. Os processos inflamatórios, independentemente de sua origem, ocasionam um crescente aumento de neutrófilos na cavidade articular, os quais produzem várias enzimas líticas como a hialuronidase e as metaloproteinases que despolimerizam o ácido hialurônico e reduzem consideravelmente sua viscosidade, por consequência, reduzindo sua capacidade de lubrificar as articulações.

PUNÇÃO ASPIRATIVA DO LÍQUIDO SINOVIAL (ARTROCENTESE)

A artrocentese traz inicialmente um alívio ao paciente, devido à drenagem do excesso de líquido na cavidade, com a

redução da pressão exercida no espaço articular, efeito descompressivo. No momento da punção, o clínico já obtém informações importantes quanto ao aspecto macroscópico da amostra, que será então encaminhada para a análise laboratorial visando à sua classificação em um dos cinco grupos já mencionados para elucidação da etiologia do derrame articular.

As contraindicações para a aspiração do LS são a presença de infecção de pele ou subcutânea adjacente ao local da punção, como as celulites, ou uma desordem de coagulação primária ou secundária ao uso de medicamentos que alteram a hemostasia sanguínea. A incidência de complicações sépticas é baixa quando o procedimento é realizado por um médico experiente.

A punção articular para a obtenção do LS é rotineiramente realizada com uma seringa heparinizada, que é prontamente encaminhada ao laboratório para a realização de todos os exames laboratoriais. É fundamental que seja obedecida a sequência de setores que irão manusear a amostra, sendo evidentemente o setor de microbiologia o primeiro, em seguida a citologia, e por último os setores de bioquímica e imunologia. A amostra de LS pode ser também fracionada em tubos com anticoagulante específico para cada setor do laboratório, para posterior análise, contanto que essa transferência seja realizada rapidamente ou de preferência no momento da coleta. É de fundamental importância que, se fracionado, se obedeça a critérios de separação no que se refere à homogeneização e cuidados de contaminação da amostra. Para o setor de citologia, seria aconselhável uma alíquota anticoagulada com EDTA a fim de se evitar a formação de coágulos e preservar o aspecto morfológico das células, de grande interesse tanto para a diferenciação dos leucócitos como para a análise da citologia oncótica. Os setores de imunologia e bioquímica, normalmente, não requerem frascos com anticoagulante. Nesses setores, as amostras devem ser centrifugadas para remover todas as células do sobrenadante. As células presentes no líquido sinovial podem alterar a concentração de algumas substâncias e também a composição química do fluído. Amostras sugestivas de artropatias sépticas devem, se possível, no momento da coleta, ser inoculadas em frascos de hemocultura ou, então, semeadas no laboratório em ágar sangue e ágar chocolate.

O procedimento de coleta e envio ao laboratório, com seringa heparinizada ou frascos com anticoagulante, irá depender da padronização do laboratório e do volume da amostra colhida.

É importante que os testes e as análises do LS sejam realizados em um tempo máximo de 1 hora após a coleta da amostra, pois os prejuízos na citologia, as alterações bioquímicas e os riscos de contaminação são significativos com o passar do tempo.

Se a análise do LS não puder ser realizada no prazo estipulado ou houver a necessidade de ser enviado para outro centro de diagnóstico para testes posteriores, a amostra deverá ser refrigerada.

ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL

A análise de líquido sinovial desempenha um importante papel no diagnóstico de doenças articulares, principalmente das monoartrites infecciosas e induzidas por cristais, para um diagnóstico definitivo. Em algumas outras situações patológicas, os testes realizados no LS não irão fornecer um diagnóstico preciso, porém irão direcionar o clínico para a realização de outros exames complementares. A interpretação dos resultados de laboratório deve ser cuidadosamente correlacionada com um histórico clínico e o exame físico do paciente.

Exames de rotina do líquido sinovial devem incluir: 1) descrição de cor e aspecto; 2) determinação da viscosidade; 3) contagem total de células (leucócitos e eritrócitos/m^3) e contagem diferencial de leucócitos (%); 4) estudos microbiológicos; 5) observação de cristais, se possível em microscopia de luz polarizada; 6) testes bioquímicos para determinar a concentração de glicose e proteínas. Outros procedimentos laboratoriais podem ser realizados em circunstâncias específicas para contribuir no diagnóstico.

Volume

A análise de líquido sinovial começa com a constatação do volume de amostra puncionada, sendo que um volume superior a 4 mL em joelho sugere um derrame articular. Esta informação normalmente é constatada pelo clínico no momento da punção. Em algumas situações em que a etiologia do derrame articular é conhecida, a artrocentese tem um objetivo especificamente descompressivo.

Cor e aspecto

O LS normal é amarelo-claro e límpido. Quando seu aspecto normal é modificado, se torna bastante interessante sua caracterização, pois existe relação direta com a etiologia do derrame. Nas artropatias não inflamatórias (grupo I) é de se esperar que o aspecto do líquido não se altere de maneira significativa; normalmente ocorre uma intensificação da cor amarela, mas sem turvação. Quando ocorre uma infiltração inflamatória (grupo II) de leucócitos, esse líquido adquire uma tonalidade cinza e apresenta turvação. Essa característica se intensifica quando o processo é de origem séptica, tornando essa amostra purulenta, extremamente turva (grupo III). Um aspecto branco e turvo pode indicar a presença de cristais (grupo IV), como ocorre na gota ou na pseudogota (condrocalcinose); derrames quilosos, embora raros, podem determinar esse mesmo aspecto e cor ao LS, como observado na artrite reumatoide. Uma amostra hemorrágica sugere extravasamento de sangue na cavidade (grupo V). Na evolução desses derrames, podemos constatar amostras xantocrômicas devido ao metabolismo da hemoglobina.

Além da observação do aspecto e cor, o LS pode conter inclusões, como os chamados "corpos de arroz", resultantes da degeneração da membrana sinovial, encontrados principalmente na artrite reumatoide. Em pacientes portadores de próteses metálicas ou plásticas podemos observar partículas pigmentadas, que se assemelham a pimenta moída, chamados de resíduos ocronóticos.

A observação macroscópica da presença de coágulos na amostra é importante devido ao fato de o LS normalmente não apresentar fibrinogênio. A formação de coágulos ocorre normalmente em amostras de processos inflamatórios ou hemorrágicos.

Teste de viscosidade

A avaliação da concentração ou da integridade do ácido hialurônico polimerizado é feita pela observação subjetiva da viscosidade do LS. Essa observação pode ser realizada no momento da transferência da amostra para um tubo onde se formam fios mucinosos ou pelo simples gotejamento da amostra. Em amostras normais os "fios mucinosos" formados apresentam entre 3 e 5 centímetros. Ainda, o teste de coágulo de mucina (teste de Ropes), também é usado para avaliação do complexo ácido hialurônico-proteína (mucina). O teste reflete o grau de polimerização do ácido hialurônico pela precipitação de sal proteico após a acidificação do líquido pelo ácido acético a 2%. Quando o coágulo formado é consistente indica que a integridade do complexo ácido hialurônico-proteína está adequada ou normal. A qualidade do coágulo é avaliada depois de 2 horas, como: 1) boa (coágulo viscoso, firme, com fluido claro sobrejacente); 2) fraco (o coágulo é macio e o sobrenadante ligeiramente turvo); e 3) pobre (coágulo pequeno, com sobrenadante turvo); e 4) muito pobre (manchas de precipitado com sobrenadante turvo). Tanto a formação do coágulo de mucina quanto a concentração do ácido hialurônico estão diminuídas nas condições inflamatórias. A importância dos testes de viscosidade e formação do coágulo de mucina são considerados por alguns autores como sendo testes não confiáveis para a classificação dos líquidos sinoviais.

Dosagens bioquímicas

Glicose

A dosagem de glicose tem um discreto valor diagnóstico em LS e deve sempre ser comparada com a glicemia. O valor de referência da glicose sinovial é de, no máximo, 10 mg/dL inferior à glicose sérica. Os processos infecciosos/sépticos são os que apresentam os valores mais reduzidos de glicose sinovial, podendo apresentar diferenças superiores a 25 mg/dL.

Proteína

Embora a concentração proteica no LS seja muito inferior à sérica, quase todos os tipos de proteína estão presentes no líquido, com exceção das proteínas de alto peso molecular como o fibrinogênio. A concentração proteica normal é de 1 a 3 g/dL e o seu aumento ocorre em condições inflamatórias de diversas origens.

Ácido úrico

O ácido úrico pode ser dosado em amostras de LS de pacientes suspeitos de gota com a intenção de diagnóstico, embora a pesquisa dos cristais de urato monossódico seja de maior valor. Os níveis de ácido úrico sinovial variam de acordo com os níveis plasmáticos, e seu valor de referência é de 6 a 8 mg/dL. Os níveis aumentados de ácido úrico levam à formação de cristais de urato monossódico na cavidade articular e consequente desenvolvimento do processo inflamatório.

Lactato

A determinação dos níveis de lactato no LS tem interesse na maioria dos casos de artropatias, porém é útil nas artrites sépticas onde os níveis de lactato são superiores a 25 mg/dL.

Como mencionado anteriormente, as determinações bioquímicas no LS têm pouco interesse diagnóstico na maioria dos casos, pois não fornecem informações além das obtidas com outros exames laboratoriais. Esse motivo levou muitos laboratórios a não mais realizar rotineiramente as dosagens de glicose, proteína e ácido úrico em amostras de LS.

Citologia

A contagem total e a contagem diferencial dos leucócitos são de grande importância na análise do LS para a classificação da amostra quanto à sua etiologia, principalmente na distinção entre um líquido séptico, inflamatório e não inflamatório. É importante ressaltar que em uma artrite séptica inicial, a contagem de leucócitos pode ser normal ou discretamente elevada, o que também poderia ser relacionado a uma artropatia inflamatória não infecciosa. A quantidade de leucócitos que se infiltra na cavidade articular é relacionada, evidentemente a etiologia do processo, mas também ao tempo de exposição ao agente ou ao tempo de mobilização celular.

A contagem de leucócitos em amostras normais não ultrapassa a 200 leucócitos/mm^3 e com uma discreta presença de neutrófilos. A maioria dos autores considera como referência valores de 0 a 150 leucócitos/mm^3, apresentando em torno de 10% de neutrófilos, 25% de linfócitos, 50% de monócitos, 10% de macrófagos, e 5% de células de revestimento sinovial. Outras células podem estar presentes em LS de relevância diagnóstica como os eosinófilos, plasmócitos e macrófagos específicos, ainda a célula de Reiter (macrófagos vacuolizados com neutrófilos englobados), e o Ragócito (neutrófilos com grânulos escuros).

Na classificação do LS, de acordo com a sua etiologia, temos como regra geral, mas não absoluta, que as desordens do Grupo I (não inflamatórias) são geralmente associadas com uma contagem de leucócitos entre 200 e 3.000/mm^3, com predomínio de monócitos e linfócitos; desordens do grupo II (inflamatórias) apresentam uma contagem entre 3.000 e 7.5000/mm^3 com um percentual alto de neutrófilos; as desordens do grupo III (infecciosas) geralmente com contagem entre 50.000 e 200.000/mm^3 com grande predomínio de neutrófilos; e finalmente as desordens do grupo IV (induzidas por cristal), com contagem de leucócitos que pode variar de 500 até 200.000/mm^3, como mostra a Tabela 16.3. A relação de mobilização dos leucócitos em processos patológicos deve ser interpretada levando-se em consideração aspectos tais

como: característica do agente etiológico, tempo de exposição ao agente, tempo de mobilização celular, e característica de integridade do paciente para uma correta correlação na classificação do LS, pois tanto a quantidade quanto a relação diferencial de leucócitos podem não ser específicos a um grupo de classificação ou apresentar relação a dois ou mais grupos.

A contagem diferencial de leucócitos também acrescenta informações valiosas ao diagnóstico. Como regra, observamos um predomínio absoluto de neutrófilos nos processos sépticos, geralmente acima de 90%. Esse predomínio também ocorre, mas de maneira não tão intensa nas artrites inflamatórias e artropatias induzidas por cristais (Tabela 16.3). Por outro lado, nos processos não inflamatórios a contagem percentual de neutrófilos normalmente é inferior a 50%. Podemos observar um predomínio de linfócitos com percentual menor de monócitos nas fases iniciais da artrite reumatoide, em infecções crônicas, no lúpus eritematoso sistêmico, e em outras colagenoses. Por outro lado, os monócitos predominam com um percentual menor de linfócitos nas infecções virais, e principalmente nas artrites crônicas induzidas por cristais.

A análise citológica do LS pode também demonstrar a presença de células LE em um percentual baixo de pacientes, que possuem lúpus eritematoso sistêmico ou artrite reumatoide. Ainda, em pacientes com artrite reumatoide tardia, podemos observar ragócitos, neutrófilos, que possuem inclusões citoplasmáticas escuras provenientes de complexos imunes, fibrina e imunoglobulinas. Essas células não são específicas da artrite reumatoide. Os condrócitos, células da cartilagem, podem estar presentes no LS de pacientes com osteoartrite ou artrite traumática.

Por último, a visualização e diferenciação das células da membrana sinovial não parece ter importância diagnóstica relevante. Essas células apresentam um aspecto morfológico semelhante às células mesoteliais da pleura e do peritônio, e em algumas situações pode ser difícil a sua diferenciação com macrófagos e histiócitos.

Como foi descrito, o exame citológico deve preferencialmente ser realizado dentro de 1 hora após a punção do LS. A citologia consiste inicialmente na contagem global de leucócitos e eritrócitos em câmara de Fuchs-Rosenthal. Contagens celulares em equipamentos de automação se mostram cada vez mais confiáveis, sendo observados alguns cuidados quanto à presença de redes de fibrina, coágulos, cristais ou qualquer tipo de substância que possa interferir na qualidade do resultado.

Amostras que apresentam coágulos ou retículos de fibrina têm comprometida a qualidade do resultado citológico e não devem ser avaliadas para formulação do diagnóstico. Em amostras purulentas, com uma quantidade muito grande de leucócitos, podemos diluir as amostras com a própria solução diluente do equipamento ou, então, usar uma solução de NaCl 0,9%. É importante que cada laboratório desenvolva contagens paralelas para conhecer a linearidade e a confiabilidade de seu equipamento em amostras de líquidos cavitários.

Seguindo com o exame citológico, a contagem diferencial de leucócitos deve ser realizada preferencialmente em preparações feitas em citocentrífuga, onde a velocidade de rotação é, em média, de 600 a 700 RPM por 3 minutos. Esse tipo de preparação proporciona uma excelente qualidade e quantidade de células para a diferenciação dos leucócitos ou a pesquisa de células neoplásicas. A coloração hematológica usada deve manter a qualidade de toda a preparação. Na experiência do autor, a coloração de May-Grünwald/Giensa satisfaz a expectativa de citologistas de boa coloração.

Pesquisa de cristais

O mecanismo que desencadeia a precipitação e o depósito de cristais na cavidade articular, ainda não foi bem esclarecido, mas vários fatores parecem pressupor que o envelhecimento, a predisposição familiar, e dano às articulações favorecem o depósito de cristais.Várias alterações metabólicas estão associadas com o depósito de certos tipos de cristais, como no hipotireoidismo, na hemocromatose, particularmente na osteoartrite e no lúpus eritematoso sistêmico. Tem sido especulado que mudanças locais na química do tecido, anomalias na matriz da cartilagem, e perda de certos inibidores podem contribuir para a deposição de cristais.

As artrites induzidas por cristais e artrites sépticas representam as duas indicações mais importantes para a artrocentese e posterior análise de líquido sinovial. Portanto, se um

Tabela 16.3 Classificação do liquido sinovial e relação do aspecto com a celularidade.

Tipo	Aspecto	Nº WBC/mm³	% Neutrófilos
Normal	Amarelo-claro e viscoso	0-200	< 10%
Não inflamatório	Amarelo- claro a levemente turvo e viscoso	200-2.000	< 20%
Inflamatório	Amarelo, levemente turvo e pouco viscoso	2.000-50.000	20-70%
Séptico	Turvo com perda de viscosidade	> 50.000	>70%
Induzido por cristais	Branco opaco	500-50.000	20-70%
Hemorrágico	Vermelho ou xantocrômico	50-10.000	20-70%

Fonte: Adaptada de Mundt LA, *et al*., 2011.

processo infeccioso não faz parte da suspeita diagnóstica, a análise do líquido sinovial para pesquisa de cristais representa a parte mais essencial de todos os exames laboratoriais do líquido sinovial.

São enfermidades relacionadas com as manifestações inflamatórias osteoarticulares decorrentes da deposição de microcristais nas articulações e foram denominadas artrites microcristalinas. Em 1876, Garrod identificou com microscopia de luz polarizada diversos tipos diferentes de cristais em LS, e somente em 1962 McCarty demonstrou que fagócitos englobam esses cristais na cavidade articular e desencadeiam um processo inflamatório. Após essas descobertas, diversos cristais foram descritos ao longo do tempo, como os cristais de monourato de sódio ou também conhecidos como urato monossódico, pirofosfato de cálcio di-hidratado, fosfato básico de cálcio (apatita), de colesterol, oxalato de cálcio, entre outros.

A identificação de cristais no LS é um dos poucos testes patognomônicos no estudo das artropatias. A observação de cristais em LS pode ser feita em microscopia óptica, levando-se em consideração o aspecto morfológico e a coloração do cristal, mas a examinação de cristais à microscopia com luz polarizada é extremamente importante para o diagnóstico diferencial das artropatias induzidas por cristais. Em alguns casos, somente esta metodologia é capaz de diferenciar certos cristais. Os cristais podem ser classificados segundo seu aspecto morfológico e sua característica de birrefringência. A análise de cristais é mais comumente realizada para o diagnóstico da gota, com a observação de cristais de urato monossódico, que apresentam aspecto de agulha e, sob luz polarizada, birrefringência negativa. Outros cristais que podem ser encontrados no LS e que têm interesse clínico incluem os cristais de pirofosfato de cálcio di-hidratado presentes na pseudogota. Esses cristais são romboides ou retangulares, com birrefringência positiva. Os cristais de colesterol podem ser vistos em derrames articulares crônicos de pacientes com osteoartrite ou artrite reumatoide de forma retangular achatada e forte birrefringência positiva. Além destes, podemos observar cristais de oxalato de cálcio, que apresentam uma forma bipiramidal, exatamente iguais aos que aparecem em urina, e os cristais de hidroxiapatita.

Análise microbiológica

Vários agentes infecciosos podem penetrar na cavidade articular através da via hematogênica (decorrente de uma infecção a distância, como pneumonia, meningite ou septicemia), por contiguidade (após um quadro de celulite, abscesso ou osteomielite), ou trauma (por inoculação direta) e desencadear uma artrite séptica. Embora as bactérias sejam os agentes mais frequentes, os vírus, as espiroquetas e os fungos também podem ser isolados como agentes causadores de artropatia infecciosa. A coloração de Gram e Ziehl-Neelsen, e culturas em ágar sangue e ágar chocolate para agentes aeróbios e anaeróbios devem ser realizadas. Alguns laboratórios para o estudo microbiológico inoculam uma alíquota da amostra diretamente em um frasco de hemocultura (para aeróbios e anaeróbios), o que aumenta a sensibilidade na detecção de microrganismos, e a probabilidade de cultura positiva para aeróbios no líquido sinovial, principalmente nos doentes sob antibioticoterapia. Culturas específicas podem ser importantes no caso de suspeita de agentes como fungos, *Mycobacterium* ou vírus. A artrite séptica ocorre quando o agente infeccioso está presente na articulação e desencadeia uma resposta inflamatória que se apresenta, geralmente, como monoartrite. A articulação do quadril é a mais acometida (principalmente nos recém-nascidos e lactentes), seguida por joelhos, cotovelos e tornozelos. O agente etiológico bacteriano mais frequente em qualquer faixa etária é o *Staphylococcus aureus*. Outros agentes bacterianos de relevância clínica estão relacionados na Tabela 16.4.

Tabela 16.4 Agentes etiológicos da artrite séptica conforme faixa etária.

Recém-nascidos	Gram-negativos Estreptococos do grupo B
Lactentes e pré-escolares	*Hemophilus influenzae*
Período escolar	Estreptococos
Adolescentes	*Neisseria gonorrhoeae*

Fonte: Adaptada de Wang CL, *et al.*, 2003.

Como vimos, para o diagnóstico de artrite séptica é obrigatória a realização da coloração de Gram, que é realizada em esfregaços de amostras centrifugadas ou preparações em citocentrífuga. Essa coloração pode apresentar certa dificuldade em amostras extremamente purulentas. A cultura do LS se mostra positiva em cerca de 70% dos casos de artrite séptica. Por outro lado, alguns agentes infecciosos são difíceis de ser cultivados, como nas artrites gonocócicas, onde mais de 2/3 das culturas são negativas. Contribuindo para o diagnóstico de artrite séptica bacteriana, ainda observamos o líquido sinovial geralmente purulento, com aumento do número de leucócitos e predomínio de neutrófilos, diminuição dos níveis de glicose, aumento de proteínas e desidrogenase lática, além de baixa viscosidade.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Brunzel NA. Fundamentals of Urine and Body Fluid analysis. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 2004.
2. Burns CM, Wotmann RL. Gout therapeutics: new drugs for an old disease. Lancet. 2011;77(9760):165-77.
3. Carro A, Battle E, Pascual E, et al. Blood cultures flasks for synovial fluid culture: a more sensitive method for the isolation of bacteria from synovial fluid, particularly brucella mellitensis. Br J Rheumatol. 1988; 27 (supplement 2):19.
4. Cerebrospinal, Seminal, Serous and Synovial fluids: A textbook Atlas. 3.ed. Chicago: ASCP Press, 1982.
5. Freemont AJ, Denton J. Synovial Fluids Analysis. In: Klippel JH and Dieppe PA. Rheumatology. 2.ed. London: Mosby, 2003. p.227-32.
6. Goergens ED, McEvoy A, Watson M, et al. Acute osteomyelitis and septic arthritis in children. J Paediatr Child Health. 2005;41:59-62.

7. Hochberg MC. Septic arthritis, osteomyelitis, gonococcal and syphilitic arthritis. 4.ed. New York: Elsevier, 2008.
8. Kjeldsberg C, Knight J. Body fluids: laboratory examination of cerebrospinal, seminal, serous & sinovial fluids. Chicago: American Society of Clinical Pathologists; 1992.
9. Mundt LA, Shanahan K. Graff's Textbook of Routine Urinalysis and Body Fluids. 2.ed. Philadelphia: Lippincott, 2011.
10. Murakami Y, Kitasato H. Recent advances in crystal-induced acute infl ammation. Curr Opin Rheumatol. 2007;19(2):146-50.
11. Nade S. Septic arthritis. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2003;17:183-200.
12. Queiroz MV. Exames laboratoriais em reumatologia. XV – Líquido Sinovial. In: Reumatologia. Lisboa: Ed. Lidel, 2002. p.220-4.
13. Sarawate CA, Patel PA, Schumacher HR, et al. Serum urate levels and gout flares: analysis from managed care data. J Clin Rheumatol. 2006;12(2):61-5.
14. Sarlin P, Mansoor I, Dagyaran C, et al. Comparison of resin--containing BACTEC plus Aerobic/F* medium, with conventional methods for culture of normally sterile body fluids. J Med Microbiol. 2000;7:787-91.
15. Strasinger SK, Di Lorenzo MS. Urinalysis and Body Fluids. 5.ed. Philadelphia: Davis company, 2008.
16. Von Essen R, Holtta A. Improved method of isolating bacteria from joint fluid by use of blood culture bottles. Ann Rheu Dis. 1986;45:454-7.
17. Wang CL, Wang SM, Yang YJ, et al. Septic arthritis in children: relationship of causative pathogens, complications, and outcome. J Microbiol Immunol Infect. 2003;36:41-6.
18. Xavier Junior GA. Artrites Microcristalinas. In: Reumatologia Diagnóstico e Tratamento. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p.17, 309-323.

17

capítulo

Patrícia Haas ▪ Pedro Luis Colturato ▪ Samuel Ricardo Comar

Líquidos Cavitários ou Líquidos Serosos

INTRODUÇÃO

No folheto embrionário mesoderme forma-se a cavidade celomática embrionária que, por sua vez, dá origem a três cavidades denominadas cavidade pleural, peritoneal e pericárdica, as quais são revestidas por duas membranas ditas membranas serosas, constituídas por tecido conjuntivo, e uma única camada de células ditas células mesoteliais, em virtude da origem mesodérmica. Uma dessas membranas reveste a parede da cavidade e se chama membrana parietal, e a outra reveste os órgãos do interior da cavidade e se chama membrana visceral. Essas membranas recebem nomes diferentes de acordo com o órgão que estão revestindo. No pulmão recebem o nome de pleura, no coração, pericárdio, e na cavidade abdominal, peritônio. Em condições normais, a lubrificação entre estas membranas é feita por uma pequena quantidade de um fluido que possui aspecto semelhante ao do soro humano, fato este que deu origem ao nome "líquidos serosos". Tal lubrificação é imprescindível para diminuir o atrito entre as membranas durante a movimentação dos órgãos. Certas condições patológicas provocam o acúmulo de líquido dentro das cavidades serosas, dando origem às chamadas efusões serosas, e o exame desse líquido acumulado possui grande valor no diagnóstico, especialmente a análise microscópica das células e a análise bioquímica. A Figura 17.1 ilustra as membranas serosas, as cavidades corporais e as vísceras.

Diariamente, muitos laboratórios de análises clínicas recebem amostras de líquidos serosos, principalmente os hospitalares. Contudo, a análise desses líquidos pelos profissionais do laboratório é normalmente realizada mediante apreensão e esquiva, talvez pelo fato de a literatura laboratorial referente aos líquidos serosos ser ainda escassa. Este capítulo tem o objetivo de fornecer subsídios, por intermédio do conhecimento e da experiência dos autores para analisar líquidos serosos com confiança, habilidade, exatidão e precisão. Geralmente, o propósito da análise laboratorial de líquidos serosos é detectar e monitorar condições tais como: inflamação, neoplasias, sangramentos e infecções nas cavidades serosas.

Uma vez que a amostra de líquido seroso chega ao laboratório para ser analisada, os testes realizados devem ser planejados para maximizar as informações que podem ser obtidas das amostras. Os tipos de testes a serem realizados devem ser selecionados e agrupados, dependendo do tipo da amostra e dos questionamentos a serem respondidos para a adequada conduta clínica. A análise macroscópica de cor e aspecto deve ser anotada e, na maioria dos casos, a contagem global e diferencial de células nucleadas torna-se item indispensável. Sempre que há suspeita da presença de células malignas, uma porção da amostra deve ser enviada ao laboratório de citologia/anatomia patológica e, nos casos de doenças hematológicas, outra porção da amostra deve ser enviada para a citometria de fluxo. Se há suspeita de infecção, uma porção da amostra deve ser enviada para cultura e Gram. Os líquidos serosos devem ser submetidos ao laboratório de bioquímica para determinação de proteínas e glicose, além de outros testes quando clinicamente recomendados. Em alguns casos, estudos complementares, como imuno-histoquímica e biologia molecular podem ser úteis, particularmente nos casos de neoplasias.

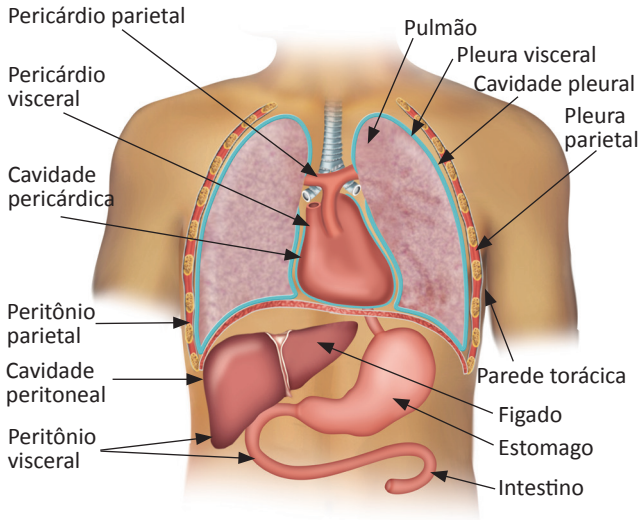


Figura 17.1 Cavidades pleural, pericárdica e peritoneal.
Fonte: CLSI, 2005.

LÍQUIDO PLEURAL

Formação, composição e funções

O líquido pleural é derivado do plasma, que atravessa os vasos sanguíneos sistêmicos das membranas pleurais a uma velocidade aproximada de 0,6 mL/h, e é absorvido em velocidade semelhante pelos vasos linfáticos da pleural parietal. A irrigação da membrana parietal é realizada pela circulação sistêmica e a da membrana visceral pela circulação sistêmica e pulmonar. O espaço entre as duas membranas é preenchido pelo líquido pleural, um microfiltrado vascular cuja principal função é a lubrificação das superfícies pleurais internas para facilitar o deslizamento das pleuras visceral e parietal durante os movimentos respiratórios. O líquido pleural, contido na cavidade pleural, normalmente apresenta volume pequeno, em torno de 1 a 20 mL ou 0,25 mL/kg. Também apresenta baixa concentração de proteínas, aproximadamente 15% da concentração de proteínas do plasma (constituídas principalmente por albumina, globulinas e fibrinogênio), e de células (principalmente células mesoteliais, monócitos/macrófagos e linfócitos), e é renovado continuamente por um balanço de forças entre a pressão hidrostática e a oncótica da microcirculação e do espaço pleural. A espessura uniforme da cavidade pleural é mantida pela sua recirculação em decorrência tanto da força da gravidade como pelos movimentos ventilatórios e cardiogênicos. As alterações nesse balanço homeostático provocam um derrame ou efusão pleural, ou seja, o aumento do volume desse fluido na cavidade pleural, como resultado de um aumento da produção que excede a taxa de remoção. Nesse desequilíbrio pode estar envolvido o aumento da permeabilidade da membrana pleural ou da pressão dos capilares pulmonares, a diminuição da pressão oncótica ou intrapleural, e/ou a obstrução do fluxo linfático.

COLETA – TORACOCENTESE

A coleta de líquido pleural é realizada por meio de um procedimento chamado toracocentese, no qual uma agulha é inserida, mediante anestesia local, na cavidade pleural para a retirada do líquido pleural. É uma técnica considerada pouco invasiva, contudo deve ser realizada pelo médico requisitante, seguindo diretrizes internacionalmente recomendadas, no intuito de acessar a cavidade pleural com segurança e minimizar possíveis variáveis pré-analíticas que possam afetar os resultados. A toracocentese é contraindicada em casos de alterações na hemostasia e quando existem lesões de pele como queimaduras por radioterapia, herpes-zóster ou piodermite, devido aos riscos de infecção e sangramento cutâneo. A complicação mais frequente do procedimento é o acúmulo de ar na cavidade pleural, conhecida como pneumotórax, cuja incidência é de 3% a 19%. Previamente à toracocentese é necessário verificar a quantidade de líquido no espaço pleural através de radiografia ou ultrassonografia a fim de saber a quantidade que poderá ser retirada. Para a maioria dos testes, 50 a 100 mL de líquido são adequados. A amostra de líquido pleural, após a coleta, deve ser fracionada em tubos.

O tubo destinado às contagens celulares deve conter EDTA, mas se a análise for realizada logo após a coleta, pode-se utilizar heparina (1 a 2 gotas para 5 mL). Para exames citopatológicos recomenda-se um volume de 50 mL (mínimo de 15 mL). Não se requer amostras estéreis, a não ser para pesquisa de microrganismos, contudo caso seja utilizado algum anticoagulante, o mesmo não deve ter efeito bactericida ou bacteriostático. O anticoagulante mais utilizado nesses casos é o polianetol sulfonato de sódio (SPS). Caso seja coletada uma pequena quantidade de amostra, a mesma deve ser enviada primeiramente ao setor de microbiologia, em seguida hematologia/citologia, e, por fim, para as análises imunoquímicas.

MANIPULAÇÃO, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO

Líquidos pleurais oriundos de coletas com grandes volumes devem ser aliquotados em volumes menores antes de serem transportados para o laboratório. As amostras devem ser gentilmente agitadas antes da aliquotagem. Recomenda-se que o transporte do local de coleta até o laboratório seja feito em temperatura ambiente, e em tempo aceitável, para manter a integridade da amostra, caso contrário pode ocorrer lise e degradação celular, assim como crescimento bacteriano. O método de transporte também pode afetar a integridade da amostra e deve ser analisado com cautela. Por exemplo, na utilização de sistema de tubos pneumáticos deve-se verificar a ocorrência de agitação excessiva dos fluidos, a qual pode resultar em dano dos constituintes celulares. É recomendado que a análise do fluido seja iniciada imediatamente após a coleta. No entanto, se não for possível, a amostra pode ser armazenada em refrigeração entre 2 °C e 8 °C, por até 48 horas. Os detalhes celulares evidenciados por colorações citológicas como *May Grünwald-Giemsa* e *Papanicolaou* permanecem adequadamente preservados com a refrigeração da amostra por alguns dias. Os autores recomendam não ultrapassar 4 (quatro) dias para evitar degradação das células. Amostras coaguladas, envelhecidas ou sem identificação devem ser rejeitadas.

PATOLOGIAS ASSOCIADAS AO DERRAME PLEURAL - TRANSUDATOS E EXSUDATOS

As efusões que podem ocorrer na cavidade pleural podem ser classificadas em transudatos e exsudatos. Os transudatos são derrames de origem não inflamatória, que ocorrem devido a um aumento da formação do ultrafiltrado vascular pelas membranas serosas, resultante de um desequilíbrio da pressão hidrostática ou osmótica. Por sua vez, os exsudatos se desenvolvem como consequência de condições patológicas tais como neoplasias, doenças infecciosas e inflamatórias, as quais aumentam a permeabilidade capilar e permitem que moléculas de alto peso molecular entrem na cavidade pleural. O diagnóstico diferencial dos exsudatos é mais extenso e comumente necessita de outras análises para se determinar a causa. O diagnóstico preciso é importante para garantir a efetividade do tratamento, sendo que o desenvolvimento do derrame e subsequente empiema pode ser debilitante e re-

sultar em internação prolongada e aumentar a morbidade. A Tabela 17.1 relata as principais causas de efusões pleurais.

ANÁLISE FÍSICA MACROSCÓPICA

O passo inicial na investigação de efusões pleurais é a análise macroscópica através da visualização da cor e do aspecto do líquido pleural e deve ser realizada antes e após a centrifugação da amostra, pois essas características auxiliam na identificação da etiologia do derrame. A cor, o aspecto e a presença ou ausência de coágulos de fibrina devem ser rotineiramente reportados pelo laboratório. Os transudatos possuem tonalidade de palha, aspecto límpido, e ausência de coágulos. Outras cores observadas em fluidos patológicos incluem: vermelho, marrom, verde, branco e preto. Um líquido purulento geralmente é associado com processo infeccioso e a presença claramente visível de pus evidencia diagnóstico de empiema. Infecções da pleura por bactérias anaeróbicas podem produzir um odor fétido, e pleurite reumatoide pode ocasionar um líquido turvo e branco esverdeado. O aspecto pode ser descrito como límpido, turvo, purulento e hemorrágico. Se o líquido for viscoso, deve ser anotado no resultado. Quando um líquido pleural é turvo, leitoso ou hemorrágico, a amostra deve ser centrifugada e o sobrenadante examinado. Se a turbidez desaparece com a centrifugação, é provável que a mesma tenha ocorrido devido a um aumento do número de células ou detritos. Todavia, se a turbidez persiste, o quadro pode ser de quilotórax ou pseudoquilotórax. A Tabela 17.2 descreve as principais possibilidades de coloração, aspecto, e sua correlação com a provável etiologia.

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

O líquido pleural pode ser infectado por diversos tipos de microrganismos, entre eles bactérias, fungos, vírus ou parasitas. Quanto maior o volume de líquido encaminhado para a análise, melhor a positividade, visto que o número de patógenos na amostra pode ser muito baixo. Assim sendo, qualquer quantidade de um patógeno importante isolado em método direto ou número de colônias isoladas em cultura deve ser considerada.

Tabela 17.1 Causas de efusões pleurais.

Transudatos	Exsudatos
Pressão hidrostática aumentada ou pressão oncótica plasmática reduzida	**Permeabilidade capilar aumentada ou reabsorção linfática reduzida**
Situações clínicas gerais	**Doenças infecciosas**
Atelectasia lobar aguda	Pneumonia bacteriana (efusão parapneumônica)
Insuficiência cardíaca congestiva	Tuberculose
Cirrose com ascite	Infecção viral
Síndrome nefrótica com hipoproteinemia	Infecção fúngica
Pós-operatório de cirurgia abdominal	Infecção parasitária
Efusão pós-parto	Abscesso pulmonar
Diálise peritoneal	**Neoplasias**
Doenças veno-oclusivas	Carcinoma metastático
Hidrotórax hepático	Câncer de pulmão
Urinotórax	Mesotelioma
Doença pericárdica	Leucemia e linfoma
Mixedema	**Embolia pulmonar**
Procedimento de Fontan	**Doença vascular do colágeno**
Transplante de medula óssea	Artrite reumatoide
Causas iatrogênicas	Lúpus eritematoso sistêmico
	Drogas indutoras de lúpus
	Linfadenopatia imunoblástica
	Síndrome de Sjögren
	Síndrome de Churg-Strauss
	Granulomatose de Wegener

(*Continua*)

Tabela 17.1 Causas de efusões pleurais. (*Continuação*)

Transudatos	Exsudatos
Pressão hidrostática aumentada ou pressão oncótica plasmática reduzida	**Permeabilidade capilar aumentada ou reabsorção linfática reduzida**
	Doenças gastrointestinais Pancreatite Ruptura esofágica Abscesso subfrênico Abscesso hepático
	Pós-enfarte do miocárdio
	Drogas Nitrofurantoína Amiodarona Dantroleno Metisergida Bromocriptina Procarbazina
	Sarcoidose
	Uremia
	Síndrome de Meigs
	Queimaduras elétricas
	Injúria iatrogênica
	Radioterapia
	Síndrome da unha amarela
	Exposição ao asbesto
	Trauma Hemotórax Quilotórax
	Efusões quilosas Trauma Linfoma Carcinomas Tuberculose

Fonte: Kjeldsberg e Knight, 1993; Mason *et al.*, 2005.

Procedimento

A amostra do líquido pleural para análise microbiológica deverá ser coletada em frasco estéril, sem adição de qualquer anticoagulante, pois esses podem inibir o crescimento de alguns microrganismos, com exceção para a cultura de micobactérias, que deverá ter adição de heparina no momento da coleta. Deve ser encaminhada ao laboratório à temperatura ambiente, o mais rápido possível, no máximo 2 horas após a coleta, para a realização dos exames diretos e culturas (cultura em geral para bactérias aeróbias, bacterioscopia, pesquisa e

Tabela 17.2 Cor e aspecto do líquido pleural antes e após a centrifugação e o possível significado clínico.

Aspecto	Coloração pré-centrifugação	Coloração pós-centrifugação	Etiologia
Límpido	Amarelo-claro	Amarelo-claro	Transudato
Turvo/hemorrágico	Róseo/vermelho	Amarelo-claro	Punção traumática Parapneumônico Empiema Neoplasia Tuberculose Aneurisma aórtico Trauma torácico Pancreatite
Turvo	Turvo	Branco leitoso	Quilotórax Linfoma Câncer Trauma
Turvo	Amarelo esbranquiçado	Branco leitoso	Pseudoquilotórax Doenças crônicas Artrite reumatoide Tuberculose

Fonte: Kjeldsberg e Knight, 1993.

cultura de BAAR, pesquisa e cultura de fungos). O líquido pleural jamais deve ser refrigerado ou congelado para a realização dos testes microbiológicos.

Cultura para bactérias aeróbias

As amostras devem ser semeadas em meios seletivos e diferencias para bactérias Gram-positivas e negativas (Ágar sangue, MacConkey e Ágar chocolate). Quando o volume de material colhido for superior a 1 mL, o mesmo deve ser inoculado, de preferência, na beira do leito, em frascos de hemocultura, e transportados à temperatura ambiente até 6 horas após a coleta. Esse procedimento aumenta a positividade e inibe a ação de antibióticos. Volumes de amostras menores do que 1 mL devem ser centrifugados e semeados em placas. Havendo suspeita de infecção por anaeróbios, a coleta deve ser em frascos a vácuo.

Bacterioscopia (Gram)

Para a confecção da lâmina, a amostra deve ser centrifugada por 15 minutos a 5.000 rpm, após remover o sobrenadante e suspender o sedimento, montar as lâminas para coloração de Gram e pesquisa de BAAR. A sensibilidade da coloração de Gram não está muito bem-documentada para o liquido pleural, mas como em outros líquidos corporais, ela raramente excede 70%. Recomenda-se a elaboração da coloração de Gram no líquido centrifugado como diagnóstico prévio à cultura. O crescimento em meios de cultura sem a visualização de bactérias na coloração prévia pelo Gram seria devido à baixa concentração de microrganismos na amostra.

Pesquisa e cultura de bacilo de Koch (BAAR)

Exame direto para pesquisa de BAAR usar a técnica de coloração de Kinyoun ou Ziehl-Neelsen, em líquido pleural centrifugado. Cultura de micobactérias. Método convencional, cultura realizada em meio sólido de Loewenstein e Jansen, de preferência com o sedimento após centrifugação. Realizada em líquido pleural heparinizado (5.000 UI/10 mL), no momento da colheita para evitar a formação de coágulos, fato esse que aprisionaria os bacilos na rede de fibrina. O rendimento da baciloscopia direta do líquido pleural tem sido próximo de zero, e a positividade de cultura em Löwenstein-Jensen de 10% a 60%.

Pesquisa e cultura para fungos

Exame direto para fungos, com uso de KOH a 20% e quando clinicamente indicado "tinta da china" (nanquim) para pesquisa da criptococose. Cultura para fungos semear em Sabouraud e/ou seletivo para fungos. A infecção por *Cryptococcus neoformans, Aspergillus spp* e *Rhizopus spp* são as doenças fúngicas graves mais frequentes em pacientes com derrames pleurais em portadores do vírus HIV e uso

de imunossupressores. As infecções fúngicas nos derrames pleurais são raras, e o acometimento pleural sem doença sistêmica ou pulmonar associada é excepcional. Blastomicose e coccidioidomicose são causas menos comuns e raras de derrames pleurais.

Considerações

Culturas para anaeróbios e fungos são indicadas quando há fracasso no tratamento ou quando há forte suspeita clínica dessas infecções. Culturas para micobactérias são sugeridas onde há grande prevalência dessas doenças na população. A execução de bacterioscopia (Gram) e de baciloscopia (Ziehl-Neelsen) são, apesar de baixa sensibilidade e especificidade, auxiliares no diagnóstico, mas não excluem as culturas. Os principais agentes encontrados nas culturas de líquidos pleurais são o *Streptococcus pneumoniae*, o *Staphylococcus aureus*, as Enterobactérias, o *Mycobacterium tuberculosis* o *Streptococcus pyogenes*, o *Haemophylus influenza*, o *Mycoplasma spp* e, raramente, a *Legionella* spp. Conforme Tabela 17.3, observa-se que o *Streptococcus pneumoniae* é o agente mais frequentemente encontrado em crianças.

Com relação ao diagnóstico do derrame pleural causado por *Mycobacterium tuberculosis* em um estudo recente realizado no Brasil foi demonstrado que os rendimentos da baciloscopia direta e da cultura para *M. tuberculosis* do escarro induzido de pacientes com derrame pleural por tuberculose, mesmo na ausência de lesão no parênquima pulmonar radiologicamente visível, alcançaram 50%. Desta forma, em pacientes com derrame pleural e suspeita de etiologia tuberculosa, a realização do escarro induzido está indicada independentemente do aspecto da radiografia de tórax.

A Tabela 17.4 representa o rendimento dos diversos exames diagnósticos, incluindo bacteriologia e cultura, em 84 casos de tuberculose pleural.

Comentários para a microbiologia

Culturas tanto para bactérias aeróbicas quanto anaeróbicas irão identificar o microrganismo responsável em cerca de 40% dos derrames parapneumônicos (70% se o líquido for totalmente purulento). O rendimento com a cultura é aumentado se o líquido pleural for inoculado na cabeceira do leito, em frascos de hemocultura. Além disso, tanto líquido pleural e expectoração devem ser cultivados para micobactérias quando pleurite tuberculosa é suspeita. O rendimento de culturas de escarro na efusão pleural tuberculosa varia de 10% a 60%, em grande parte dependente do grau de envolvimento pulmonar associado. A hipersensibilidade retardada desempenha importante papel na patogênese da pleurite tuberculosa, por isso não é possível isolar *o Mycobacterium tuberculosis* a partir de amostras de líquido pleural em mais do que 60% dos pacientes. Cerca de 1/3 dos pacientes com pleurite tuberculosa tem um teste cutâneo tuberculínico negativo.

Tabela 17.3 Principais agentes encontrados em derrames pleurais e culturas de sangue em 117 casos no Hospital Universitário de São Paulo.

Agente	Total	Derrame pleural	Cultura de sangue
Streptococcus pneumoniae	45 (61,6%)	34 (58,6%)	11 (73,4%)
Staphylococcus aureus	11 (15%)	9 (15,5%)	2 (13,3%)
Haemophilus influenza	4 (5,5%)	2 (3,5%)	2 (13,3%)
Streptococcus pyogenes	4 (5,5%)	4 (6,9%)	-
Escherichia coli	3 (4,1%)	3 (5,2%)	-
Enterococcus sp	2 (2,7%)	2 (3,5%)	-
Klebsiella pneumoniae	1 (1,4%)	1 (1,7%)	-
Streptococcus pneumoniae	45 (61,6%)	34 (58,6%)	11 (73,4%)
Staphylococcus aureus	11 (15%)	9 (15,5%)	2 (13,3%)
Haemophilus influenza	4 (5,5%)	2 (3,5%)	2 (13,3%)
Streptococcus pyogenes	4 (5,5%)	4 (6,9%)	-
Escherichia coli	3 (4,1%)	3 (5,2%)	-
Total	**73 (100%)**	**58 (100%)**	**15 (100%)**

Fonte: Cirino *et al.*, 2004.

Tabela 17.4 Rendimento dos vários métodos diagnósticos em 84 casos de tuberculose pleural.

Método diagnóstico	Total	*HIV (-)	HIV (+)
	84 casos	71 casos	13 casos
	N (%)	N (%)	N (%)
Diagnóstico presuntivo	5 (6)	5 (7)	0 (0)
Fragmento pleura	78 (93)	65 (9)	13 (100)
Diagnóstico bacteriológico	52 (62)	42 (59)	10 (77)
Diagnóstico histológico	66 (78)	54 (76)	12 (92)
Líquido pleural	10 (12)	7 (10)	3 (23)
BAAR**	2 (2)	1 (1)	1 (8)
Cultura para TB***	9 (11)	7 (10)	2 (15)
Escarro induzido	44 (52)	34 (48)	10 (77)
BAAR	10 (12)	7 (10)	3 (23)
Cultura para TB	44 (52)	34 (48)	10 (77)

*HIV: vírus da imunodeficiência humana.

** BAAR: bacilo-álcool ácido resistente.

***TB: tuberculose.

Fonte: Seiscento *et al.*, 2006.

ANÁLISE MICROSCÓPICA DAS CÉLULAS

Na realização da contagem global de células nucleadas no líquido pleural e nos demais líquidos serosos, o setor de hematologia/citologia deve utilizar, preferencialmente, amostras frescas, não centrifugadas e devidamente homogeneizadas, enquanto para a contagem diferencial de células nucleadas deve-se utilizar o sedimento obtido por centrifugado em baixa rotação, seguido de ressuspensão em solução salina - NaCl 0,9%. Uma alíquota do sobrenadante do líquido centrifugado deve ser identificada e armazenada em geladeira durante 30 dias para eventuais necessidades de outras dosagens.

Contagem global de células

A contagem global de células é uma etapa muito importante para fazer a diferenciação entre transudatos e exsudatos. Os tipos celulares que são normalmente encontrados no líquido pleural e nos demais líquidos serosos são os eritrócitos e as células nucleadas, que incluem leucócitos, macrófagos e células mesoteliais. A contagem global de células é realizada rotineiramente em câmara de Neubauer. No entanto, pode ser realizada em qualquer câmara de contagem celular equivalente, por exemplo, *Fuchs-Rosenthal, Nageotte, Büerker, Thoma e Malassez*. Há variações do procedimento manual de contagem, tanto que alguns laboratórios contam as células em microscópio óptico com o emprego de corantes para melhorar o reconhecimento das células, e outros utilizam microscopia de contraste de fase. O importante é que cada laboratório estabeleça e padronize seu próprio procedimento.

Previamente ao procedimento de contagem, a amostra deve ser devidamente homogeneizada por rotação durante 2 a 5 minutos, ou por inversão do tubo 10 a 15 vezes. A correta homogeneização da amostra impacta diretamente na acurácia da contagem. Contagens de células nucleadas de aproximadamente 200/μL ou eritrócitos de cerca de 400/μL provocam uma discreta turvação no líquido. Se o líquido estiver levemente hemorrágico, a contagem de eritrócitos pode ser realizada com a amostra não diluída, contudo a contagem de células nucleadas deve ser feita com o uso de uma pequena diluição (1:2) com líquido de Türk ou solução aquosa de fucsina 0,2% para lisar os eritrócitos e permitir uma contagem acurada.

Apesar de a contagem de eritrócitos possuir limitado valor diagnóstico, muitos laboratórios ainda a realizam. Portanto, se o fluido estiver francamente hemorrágico, uma diluição de 1:200 com solução salina isotônica e 1:2 ou 1:20 com líquido de Türk ou solução aquosa de fucsina 0,2% pode ser utilizada para obter contagens acuradas de eritrócitos e células nucleadas respectivamente.

O número de quadrantes a serem contados no hemocitômetro deve ser determinado com base no número de células presentes na amostra. De modo geral, todos os nove quadrantes de ambos os lados do hemocitômetro devem ser

contados. Se o número de células for elevado, entretanto, quatro ou menos quadrantes podem ser contados. Cada quadrante possui uma área de 1 mm^2 e profundidade de 0,1mm, resultando em um volume de 0,1 mm^3. A fórmula para calcular o número de células é:

$$\text{Contagem de células}/\mu L = \frac{\text{Células contadas} \times \text{fator de diluição}}{\text{Área contada } (mm^2) \times \text{profundidade da câmara (mm)}}$$

Observação: $\mu L = mm^3$

As diretrizes a seguir são recomendadas para definição da área a ser contada:

1. Se um número estimado de menos de 200 células estiver presente nos nove quadrantes, deve-se contar todos os nove quadrantes. Neste caso, a área contada é de 9 mm^2.
2. Se um número estimado de mais de 200 células estiver presente nos nove quadrantes, deve-se contar os quatro quadrantes laterais. Neste caso, a área contada é de 4 mm^2.
3. Se um número estimado de mais de 200 células estiver presente em um quadrante, deve-se contar cinco quadrados menores, que ficam dentro do quadrante central. Neste caso, a área contada é de 0,2 mm^2.

A câmara de contagem deve ser colocada sob o microscópio óptico e no aumento de 100× (objetiva 10× e ocular 10×) deve-se verificar a distribuição das células nos quadrantes. Para uma boa precisão, não deve haver mais que 10% de variação do número de células entre os quadrantes maiores. Diferenças maiores que 10% indicam erros técnicos de preenchimento da câmara e o procedimento deve ser repetido. Não deve haver sobreposição de células. A contagem propriamente dita deve ser feita no aumento de 400×. Um número apropriado de quadrantes deve ser contado, dependendo do número de células presentes, sendo que quanto mais células presentes, menos quadrantes necessitam ser contados.

A câmara de Neubauer possui profundidade de 0,1 mm, e a área total de contagem é de 9 mm^2. Essa área de contagem é dividida em nove quadrantes de 1 mm^2. O quadrante central é dividido em 25 quadrantes pequenos, e estes, por sua vez, são subdivididos em 16 quadrantes ainda menores, conforme Figura 17.2.

Para diferenciar as células nucleadas dos eritrócitos na contagem global, é necessário conhecer as características de

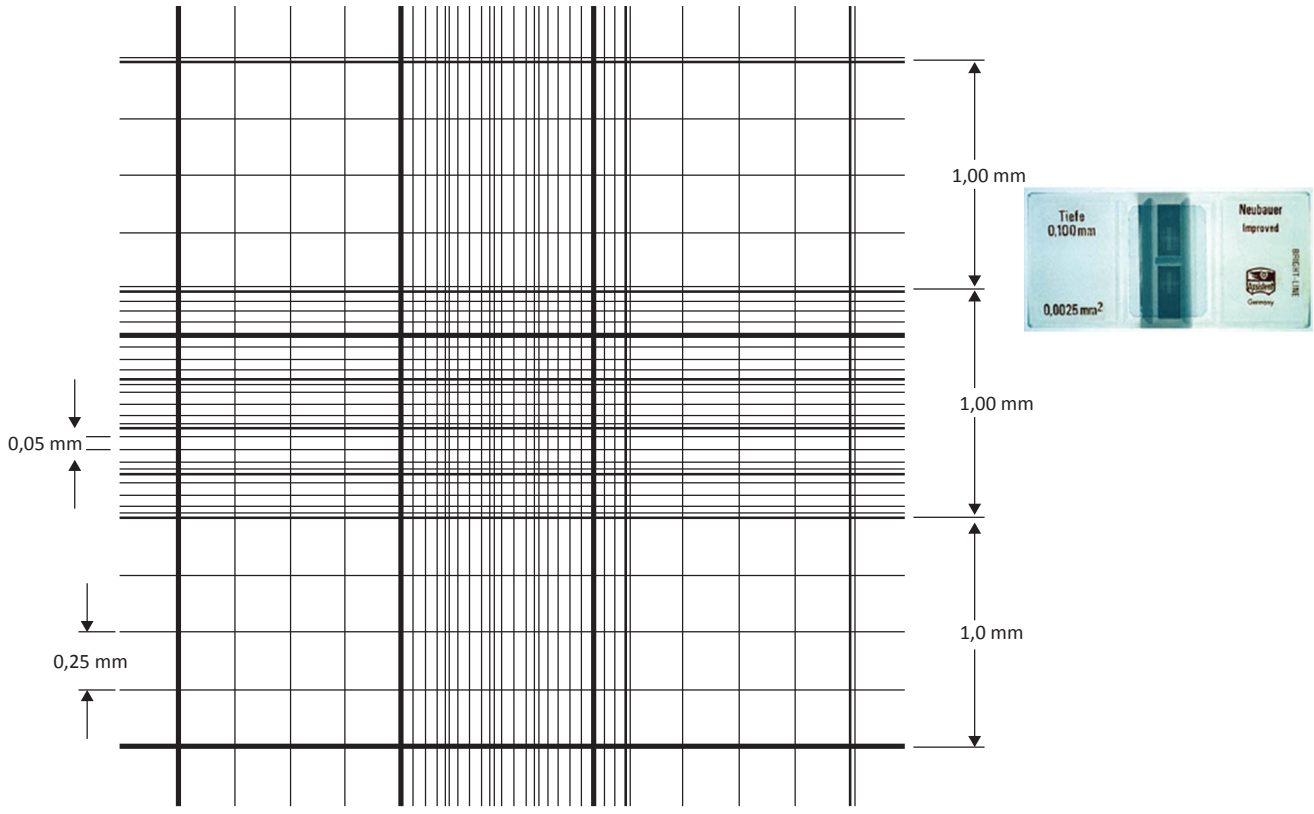


Figura 17.2 Área de contagem da câmara de Neubauer.
Fonte: Science services, 2012.

cada uma dessas células. Os eritrócitos têm um contorno regular, com halos e centro celular limpo. Se tiverem crenados, aparecem muitas projeções finas e pontudas. Os leucócitos apresentam aspecto granular e são levemente refringentes, e as células mesoteliais e macrófagos são geralmente células grandes e granulares, com contornos irregulares. A diferenciação entre células mesoteliais e leucócitos é realizada na contagem diferencial, e no laudo pode-se relatar a quantidade total de células nucleadas e especificar quantos leucócitos fazem parte desse total.

Contagem diferencial de células nucleadas

A confecção da lâmina para a realização da contagem diferencial de leucócitos é realizada rotineiramente em câmara de Suta ou em citocentrífuga, utilizando o sedimento obtido da centrifugação ressuspenso em solução salina. A câmara de Suta possui um sistema de filtros de papel que absorve a parte líquida da amostra permitindo a concentração das células. A quantidade de líquido a ser colocada na câmara depende da quantidade de células nucleadas presentes (Tabela 17.5). É um processo trabalhoso e demorado, porém fornece um esfregaço de boa qualidade.

Tabela 17.5 Volume de amostra utilizado na câmara de Suta de acordo com a celularidade da amostra.

Contagem global (/μL)	Volume de amostra (mL)
10-50	1,5-2,0
50-100	1,2-1,8
100-200	1,0-1,5
200-500	0,8-1,0
500-1.000	0,5-0,8
> 2.000	0,2-0,3

Fonte: Comar *et al.*, 2009.

Nessa técnica deve-se envolver a lâmina sob um papel absorvente, o qual deve conter um halo de diâmetro discretamente menor que o diâmetro do tubo conector da câmara. Coloca-se, então, a lâmina na câmara e parafusa-se o tubo conector até ele tocar na lâmina. Não se deve apertar muito, pois pode impedir a absorção por capilaridade. Na sequência, coloca-se na câmara a quantidade de líquido necessária e, então, espera-se as células se concentrarem no centro do halo, à medida que o líquido for absorvido por capilaridade. Quando estiver seca, o tubo conector e o papel absorvente devem ser retirados com cuidado para não arrastar as células aderidas. Em seguida, realiza-se a coloração de *May Grünwald-Giemsa*.

Para melhores resultados na confecção de lâminas para contagem diferencial em líquidos biológicos, recomenda-se a utilização de citocentrífuga por possibilitar melhor concentração das células, minimizando distorções celulares e produzindo uma monocamada de células randomicamente dispersas em uma pequena área circular, ideal para realizar a contagem diferencial e subclassificar as células nucleadas. A citocentrífuga geralmente possui uma tigela com várias unidades de montagem das lâminas. Essas unidades consistem de um papel de filtro colocado logo após uma lâmina de vidro e uma câmara para conter a amostra, seguramente unidas por um grampo. A câmara possui uma passagem interna cilíndrica por onde a amostra passa e entra em contato com a lâmina de vidro. Durante a centrifugação o fluido contendo as células é forçado em direção à lâmina de vidro e o papel de filtro absorve a parte líquida enquanto as células são depositadas na lâmina. Mesmo amostras hipocelulares, com contagem em câmara igual a zero, podem ter um campo de aproximadamente 35 células. A velocidade e o tempo de centrifugação, a quantidade de amostra dispensada na câmara e a qualidade de absorção do papel de filtro são fatores que podem influenciar tanto a celularidade do botão quanto a morfologia das células. Os corantes do tipo Romanowsky fornecem excelentes detalhes morfológicos e as células se apresentam de maneira semelhante a suas contrapartidas no sangue periférico e na medula óssea. Quando há suspeita de células malignas, todo o botão celular deve ser observado microscopicamente, uma vez que as células malignas podem estar presentes em pequenas quantidades.

Embora a citocentrífuga não seja um equipamento de manuseio complexo, algumas orientações podem melhorar a qualidade das lâminas:

1. Para a confecção da lâmina deve-se utilizar, preferencialmente, amostras frescas e não fixadas. Se há atraso prolongado no preparo das lâminas, maior que 8 horas, deve-se colocar uma observação nos resultados de que a contagem diferencial pode ter sido prejudicada devido à degeneração celular.
2. Líquidos serosos podem conter fibrina e outras proteínas que podem obstruir a área circular do papel de filtro, reduzindo o tamanho do botão celular e afetando a distribuição randômica das células na lâmina. Lavar as células antes da citocentrifugação, por meio de centrifugação de uma alíquota e ressuspensão em solução salina pode evitar problemas com o botão celular e a morfologia das células.
3. Se coágulos estiverem presentes na amostra, ambas as contagens – global e diferencial de células – podem perder precisão e exatidão. Contudo, lâminas podem ser preparadas para a pesquisa de células malignas. Os coágulos podem ser agitados gentilmente para libertar células aprisionadas antes de aliquotar uma porção da amostra para lavagem e citocentrifugação.
4. Amostras com elevada celularidade devem ser diluídas com salina antes da citocentrifugação para evitar sobreposição de camadas de células na lâmina. Esse

tipo de lâmina é de difícil interpretação devido ao agrupamento das células e à distorção da morfologia. Utilizando-se um esquema padronizado para a diluição das amostras com base na contagem global, uma lâmina com monocamada uniforme de células pode ser obtida. A diluição apropriada vai depender da quantidade de amostra inserida na câmara e da velocidade e do tempo de citocentrifugação. Alternativamente, para amostras hemorrágicas, alguns laboratórios preferem gentilmente lisar os eritrócitos antes da citocentrifugação.

5. Adicionando-se uma gota de albumina 22% na câmara, juntamente com a amostra, acentua-se a aderência das células ao vidro da lâmina e reduz-se a desintegração celular, especialmente em amostras com baixa concentração de proteínas.
6. Um alinhamento adequado da câmara de amostra com o orifício do papel de filtro é essencial para se formar um botão celular apropriado.
7. Após a citocentrifugação, as lâminas devem ser mantidas longe de umidade até serem fixadas ou coradas para evitar artefatos que resultam em encolhimento ou arredondamento das células.

A lâmina confeccionada é lida em microscópio óptico, sendo que é necessário correr a lâmina corada usando as objetivas de 10× e 40× inicialmente para verificar a distribuição dos tipos celulares e procurar agrupamentos de células. A contagem é realizada na objetiva de imersão e 100 células devem ser diferenciadas. Se não for possível, é necessário contar todas as células presentes e posteriormente calcular a porcentagem de cada tipo celular presente. É necessário diferenciar os leucócitos das células mesoteliais que, por participarem do processo inflamatório, podem se desprender e aparecer no líquido pleural. O procedimento deve ser repetido quando a celularidade presente na lâmina não corresponder ao esperado, de acordo com a contagem global de células, e nos casos em que houver sobreposição de células, dificultando a contagem. De acordo com o resultado obtido na contagem diferencial, deve-se calcular qual é o número de células mesoteliais e leucócitos presentes na contagem global.

Celularidade encontrada no líquido pleural

Os tipos celulares encontrados no líquido pleural incluem leucócitos, macrófagos, células mesoteliais e células metastáticas de tumores sólidos. Dentre os leucócitos estão incluídos neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, linfócitos, plasmócitos, granulócitos imaturos e blastos. Embora a morfologia dessas células nos líquidos serosos seja similar à encontrada no sangue periférico e na medula óssea, as mudanças morfológicas em decorrência de alterações degenerativas são mais frequentes. Microrganismos como bactérias e fungos podem ser visualizados. A Tabela 17.6 mostra a interpretação dos tipos celulares encontrados no líquido pleural.

Tabela 17.6 Interpretação dos tipos celulares encontrados no líquido pleural.

Tipo celular	Condição
Neutrofilia > 50% de PMN	Inflamação aguda e processos infecciosos
Eosinofilia > 10%	Pneumotórax, embolia pulmonar, hemotórax traumático, doenças parasitárias, síndrome de Churg-Strauss
Linfocitose > 50%	Transudatos, tuberculose, câncer, cirurgia coronariana, doenças linfoproliferativas, efusões quilosas
Macrófagos	Limitado valor diagnóstico, eritrófagos, siderófagos e hematoidinófago são úteis na distinção entre fluidos patológicos e punções traumáticas
Blastos	Neoplasias hematológicas
Plasmócitos	Condições reativas, mieloma múltiplo
Células mesoteliais	Constituinte normal (≥ 2%), diminuída na tuberculose (< 0,1%)
Células neoplásicas de tumores sólidos	Carcinoma metastático
Miscelânea	
Células LE	Lúpus eritematoso sistêmico
Células de Reed-Sternberg	Doença de Hodgkin
Megacariócitos	Doenças mieloproliferativas

Fonte: CLSI, 2005.

Pesquisa de células LE no líquido pleural

A pesquisa de células LE é um teste citomorfológico que avalia indiretamente a presença de anticorpos antinucleares. Sua formação ocorre em duas fases distintas. Inicialmente, acontece a interação do núcleo com o anticorpo antinuclear, geralmente da classe IgG. O núcleo já sensibi-

lizado é fagocitado por leucócitos íntegros, especialmente neutrófilos e monócitos, na presença da fração C1 do complemento, dando origem à célula LE. É um fenômeno inespecífico, que ocorre em cerca de 60% a 80% dos casos de lúpus eritematoso sistêmico, mas que pode ser encontrado em outras colagenoses e em reações ao uso de medicamentos como hidralazina, procainamida, dentre outros. A pesquisa normalmente é realizada em amostra de sangue periférico, embora também possa ser realizada em amostras de líquidos serosos. A presença de célula LE no líquido pleural parece ser altamente específica para pleurite lúpica, contudo sua sensibilidade é baixa e variável. A técnica possui pequenas diferenças em relação à utilizada no sangue periférico e é descrita abaixo:

1. Colher 10 mL de sangue total de um doador normal em um tubo com uma gota de heparina.
2. Transferir a amostra para um frasco com 10 pérolas de vidro.
3. Agitar durante 30 minutos a 180 rpm em agitador de Kline.
4. Passar a amostra para um tubo de ensaio, centrifugar por 15 minutos a 3.000 rpm.
5. Com uma agulha grossa, retirar 2 mL da camada de leucócitos e transferir para um tubo de macro-hematócrito ou de VHS (utilizado na automação).
6. Adicionar a este tubo 2 mL do líquido pleural em teste.
7. Homogeneizar durante 10 minutos e, em seguida, deixar em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente.
8. Centrifugar durante 15 minutos a 3.000 rpm.
9. Com uma agulha grossa, retirar 2 mL da camada de leucócitos e transferir para um tubo de macro-hematócrito ou de VHS (utilizado na automação).
10. Centrifugar durante 15 minutos a 3.000 rpm.
11. Com uma agulha grossa, retirar a camada de leucócitos e fazer cinco extensões sanguíneas.
12. Corar a lâmina pelo método de May Grünwald-Giemsa.
13. Observar em microscópio óptico e procurar as células LE em todas as lâminas preparadas.

A positividade do teste se dá pelo aparecimento de leucócitos com inclusões homogêneas, violáceas, amorfas ou de rosetas. Diversos leucócitos podem envolver o material nuclear amorfo e, juntamente com estes, ainda podem aparecer corpos nucleares amorfos livres.

DIFERENCIAÇÃO DE TRANSUDATO E EXSUDATO

A análise citológica e bioquímica do líquido pleural permite a diferenciação entre transudato e exsudato, que é indispensável para definir a etiologia do derrame. As Tabelas 17.7 e 17.8 mostram os valores que caracterizam a amostra como transudato ou exsudato.

Tabela 17.7 Valores que caracterizam a amostra como um transudato.

Transudatos
Contagem de leucócitos < 1.000/ μL
Razão de proteínas líquido/soro < 0,5
Proteínas totais < 3 g/dL
Razão de glicose líquido/soro < 0,5
Glicose > 60 mg/dL
Razão LDH líquido/soro < 0,6
Colesterol < 60 mg/dL
pH = 7,6
Albumina soro - Albumina líquido = 1,6 ± 0,5 g/dL
Aparência = transparente (amarelo-claro e límpido)
Amilase = de 0 a 130 UI/L
Densidade < 1,015
Lactato desidrogenase (LDH) < 200 UI/L
Coagulação espontânea = ausente
Bilirrubina direta (BD) = 0,1-0,5 mg/dL
Bilirrubina total (BT) = 0,2-1,5 mg/dL
Triglicerídeos < 200 mg/dL

Fonte: Kjeldsberg e Knight, 1993.

Tabela 17.8 Valores que caracterizam a amostra como um exsudato.

Exsudatos
Contagem de leucócitos > 1.000/ μL
Razão de proteínas líquido/soro ≥ 0,5
Proteínas totais > 3 g/dL
Razão de glicose líquido/soro > 0,5
Glicose < 60 mg/dL
Razão LDH líquido/soro ≥ 0,6
Colesterol > 60 mg/dL
pH < 7,6
Albumina soro - Albumina líquido = 0,6 ± 0,4 g/dL
Aparência = opaca, turva
Densidade > 1,015
Lactato desidrogenase (LDH) > 200 UI/L
Coagulação espontânea = possível

Fonte: Kjeldsberg e Knight, 1993.

ANÁLISE BIOQUÍMICA

Quando se constata que um paciente apresenta derrame pleural, a primeira etapa é definir se o derrame é um transudato ou exsudato. O líquido pleural normal é um transudato, e as efusões transudativas ocorrem em consequência do aumento da pressão hidrostática capilar ou diminuição da pressão oncótica; já os exsudatos são associados com distúrbios localizados, que aumentam a permeabilidade capilar ou reabsorção linfática diminuída.

Os critérios de Light foram difundidos na prática clínica para distinção dos líquidos pleurais e são baseados na dosagem bioquímica de proteínas, LDH e sua relação entre líquido/soro. Sugere-se que basta preencher um ou mais dos critérios descritos na Tabela 17.9 para classificar o líquido como um exsudato.

Tabela 17.9 Critérios de Light para o diagnóstico de exsudato no derrame pleural.

Proteína líquido pleural/proteína sérica total	≥ 0,5
LDH líquido pleural LDH sérico total	≥ 0,6
LDH líquido pleural	>2/3 LDH sérico ou >220 U/L

Fonte: Light, 2002.

Os exames bioquímicos no líquido pleural devem ser simultaneamente coletados com o soro do paciente. Todos os exames de bioquímica no líquido pleural são realizados em frasco seco, estéril, e sem anticoagulante.

Proteínas e gradiente de albumina

As proteínas não devem ser usadas de forma isolada para a classificação dos derrames pleurais, devendo ser combinadas com outros parâmetros para diferenciar os transudatos e exsudatos. A Tabela 17.10 demonstra os valores de proteínas nos derrames pleurais para auxiliar na classificação dos transudatos e exsudatos.

Tabela 17.10 Valores de proteínas nos derrames pleurais para classificação dos transudatos e exsudatos.

Proteínas ≤ 3,0 mg/dL	Transudato
Proteínas entre 3,0 e 3,5 mg/dL	Transudato ou Exsudato (aplicar Light)
Proteínas ≥ 3,5 mg/dL	Comumente Exsudato (aplicar Light)
Proteínas ≥ 4,5 mg/dL	Sugere-se, como primeira hipótese, Tuberculose

Fonte: Xaviel *et al.*, 2005.

O gradiente sérico-pleural de albumina consegue reduzir significativamente as classificações falsas de exsudatos. Os transudatos apresentam um gradiente > 1,2 g/dL, enquanto os exsudatos apresentam um gradiente < 1,2 g/dL.

Outros critérios foram adotados para a classificação dos derrames pleurais conforme Tabela 17.11.

Tabela 17.11 Critérios de diagnóstico de exsudato pleural.

Gradiente sérico-pleural de albumina ≤ 1,2 g/dL
Colesterol pleural > 60 mg/dL
Relação pleural-sérica de colesterol > 0,3
Relação pleural-sérica de bilirrubina > 0,6

Fonte: Roth *et al.*, 1990.

Glicose

O nível de glicose do líquido pleural é semelhante ao sérico. A dosagem dos níveis de glicose no líquido pleural tem sido usada no diagnóstico diferencial das doenças que originam exsudatos. Valores inferiores a 60 mg/dL ou uma relação glicose líquido pleural/soro inferior a 0,5 são consistentes com derrames parapneumônicos, empiema, artrite reumatoide, doença neoplásica e tuberculose. Quando o líquido é espesso e purulento, o nível de glicose é frequentemente próximo de zero. Os transudatos apresentam valores de glicose no líquido pleural similares aos séricos.

Lactato Desidrogenase (LDH)

A dosagem de LDH é primordial na diferenciação entre transudatos e exsudatos conforme os critérios de Light. Está aumentada nos exsudatos, principalmente de origem neoplásica, infecciosa ou no tromboembolismo pulmonar. Valores de LDH superiores a 200 UI/L ou relação LDH do líquido pleural/soro maior que 0,6 indicam exsudatos.

Níveis superiores a 1.000 UI/L são caracteristicamente encontrados em empiema, pleurisia reumatoide e malignidades.

pH

Deve ser coletado numa seringa de gasometria heparinizada e encaminhado ao laboratório conservado em gelo. O pH normal do líquido pleural é de 7,64. Uma combinação de pH < 7,20 com glicose < 40 mg/dL pode indicar necessidade de drenagem torácica cirúrgica por efusão parapneumônica associada com empiema, pleurite reumatoide ou efusão maligna com mau prognóstico. Um pH abaixo de 6,0 é característico de ruptura esofágica.

Amilase

Deverá ser dosada somente em casos sugestivos de pancreatite ou pseudocisto pancreático. A dosagem de amilase pode ser elevada em certas neoplasias, não necessariamente do pâncreas. Diferenciar amilase pancreática de amilase salivar, sendo que a última sugere fístula esofágica ou trauma de esôfago.

Adenosina Desaminase (ADA)

Devido à necessidade de um marcador rápido e eficaz para a tuberculose, a ADA vem aparecendo como mais um parâmetro bioquímico. Foi recomendado o valor de corte adequado da ADA de 35 U/l no líquido pleural para o diagnóstico da tuberculose, em nosso país, devido à alta prevalência desse microrganismo em nossa população. A Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia sugere, entretanto, o valor de corte de 40 U/l no líquido pleural. Com uma atividade baixa de ADA, num derrame pleural, pode-se praticamente excluir a etiologia por *Mycobacterium tuberculosis*, mas valores elevados devem ser distinguidos de outras causas como empiemas e linfomas.

Lipídios

O aparecimento de um líquido pleural leitoso pode ser causado pela presença de material quiloso do ducto torácico ou material pseudoquiloso, produzido em condições inflamatórias crônicas. O material quiloso apresenta altas concentrações de triglicerídeos; já o material pseudoquiloso tem maior concentração de colesterol. Um nível de triglicerídeos superior a 110 mg/dL indica uma efusão quilosa. Para os valores intermediários entre 50 e 110 mg/dL o diagnóstico pode ser feito pela demonstração de quilomícrons no líquido pleural por eletroforese das lipoproteínas. As dosagens de colesterol são recomendadas quando os valores de LDH e proteínas são duvidosos, valores de colesterol no líquido pleural superiores a 60 mg/dL ou relação líquido pleural/soro superiores a 0,3 estão associados com exsudatos.

Bilirrubinas

Meisel *et al.*, 1990, concluíram que uma relação pleural-sérica de bilirrubina > 0,6 seria um parâmetro alternativo aos critérios de Light para a determinação dos exsudatos.

Marcadores tumorais

São úteis no acompanhamento e na diferenciação de algumas neoplasias, carcinomas ou mesoteliomas, e avaliação da resposta ao tratamento e prognóstico. A Tabela 17.12 descreve os principais marcadores utilizados em líquidos serosos.

Tabela 17.12 Relação dos marcadores tumorais e principais afecções.

Marcadores tumorais	Principais afecções relacionadas
Ácido hialurônico	Mesotelioma.
Antígeno carcinoembriogênico (CEA)	Adenocarcinoma de cólon e reto, Ca de pulmão, trato gastrintestinal, biliar, cérvice e mama
Alfafetoproteína (AFP)	Tumor gastrintestinal, hepatocarcinoma, hepatite e cirrose
CA 15-3	Mama, ovário, pulmão e linfomas
CA 19-9	Pâncreas, vesícula biliar, estômago, mama e pulmão
CA 125	Ovário e gástrico, células pequenas de pulmão, mesotelioma
CYFRA 21-1	Cânceres de pulmão

Fonte: Fonseca, 2011.

Provas reumáticas

Cerca de 5% dos doentes com artrite reumatoide e 50% dos doentes com lúpus eritematoso sistêmico desenvolvem derrames pleurais durante a evolução da doença. Na suspeita de colagenoses podem ser dosados no líquido pleural o fator antinuclear (FAN), fator reumatoide (FR), anti-DNA, anticorpo anticitoplasma de neutrófilos (ANCA). A Tabela 17.13 apresenta um resumo dos testes realizados no líquido pleural.

CASOS CLÍNICOS

Caso 1

Uma mulher de 45 anos de idade com história de câncer de mama apresentou uma efusão pleural. O líquido obtido tinha aspecto hemorrágico e apresentou uma contagem de células nucleadas de 650/μL. Foi preparada uma lâmina na citocentrífuga, a qual apresentou na análise microscópica vários neutrófilos e poucos macrófagos e linfócitos. Observaram-se, também, vários grupamentos de células grandes e fortemente coradas. O grupamento tinha aspecto tridimensional e continha algumas figuras de mitose. Qual é a mais provável identificação dessas células?

a) Condrócitos
b) Pneumócitos
c) Células mesoteliais ativadas
d) Células tumorais metastáticas

Resposta: d.

Tabela 17.13 Resumo dos testes no líquido pleural.

Teste	Valor do teste	Diagnóstico sugerido	Comentários
A adenosina desaminase (ADA)	> 40 U/L	A tuberculose (> 90%), empiema (60%), derrame parapneumônico complicado (30%), malignidade (5%), artrite reumatoide	Deve ser solicitada com frequência devido ao alto valor preditivo positivo para TB
Citologia	Eficácia de 40% a 87%	Malignidade	Eficácia depende de diversos fatores: tipo histológico do tumor, capacidade de esfoliação das células, número de lâminas examinadas e perícia do citologista
Glicose	< 60 mg/dL	Derrame parapneumônico complicado ou empiema, tuberculose (20%), malignidade (<10%), artrite reumatoide	Em geral, os fluidos pleurais com baixo nível de glicose também têm pH baixo e os níveis elevados de LDH
Lactato desidrogenase (LDH)	> Dois terços dos limites superiores do normal para soro LDH	Qualquer condição que causa um exsudato	Níveis muito elevados de LDH pleural (> 1.000 UI/L) normalmente são encontrados em pacientes com derrame pleural parapneumônico complicado e em cerca de 40% das pessoas com pleurisia tuberculosa
Derrame – LDH relação sérica	> 0,6	Qualquer condição que causa um exsudato	A maioria dos pacientes que preenchem os critérios para uma efusão exsudativa com LDH, mas não com os níveis de proteína tem derrames parapneumônicos ou malignidade
Derrame proporção de proteína /soro	> 0,5	Qualquer condição que causa um exsudato	Um nível de proteína do fluido pleural > 3 mg por dL sugere um exsudado. Não usar isoladamente
Amilase	> Limite superior do normal	Malignidade (< 20%), doença pancreática ou ruptura esofágica	Dosar quando a ruptura esofágica ou doença pancreática é suspeita
Colesterol	> 45 a 60 mg/dL	Qualquer condição que causa um exsudato	Dosar na suspeita de quilotórax ou pseudoquilotórax. Valores superiores a 60 mg/dL são favoráveis a exsudato.
Cultura	Positivo	Infecção	Realizar em todos os derrames pleurais parapneumônicos, pois bactérias no Gram ou cultura sugerem drenagem torácica
pH	< 7,20	Derrame parapneumônico complicado ou empiema, malignidade ou tuberculose	Obter em todas as efusões não purulentas, se houver suspeita de infecção. Um pH reduzido de líquido pleural indica a necessidade de drenagem apenas para derrames pleurais parapneumônicos
Triglicerídeos	> 110 mg por dL	Quilotórax	Realizar quando o líquido pleural é turvo ou leitoso. O QT é causado por linfoma ou trauma. Nem todos os derrames pleurais quilosa aparecem branco leitoso ou esbranquiçados
Marcadores tumorais	Diversos pontos de *cutoff*	Malignidade	CEA, CA 15-3, CA 125, Cyfra 21-1, α-fetoproteínas; dosar ácido hialurônico quando suspeitar de mesotelioma

Fonte: Porcel e Light, 2006.

Caso 2

Um homem de 72 anos apresentou os seguintes resultados na análise do líquido pleural. EXAME FÍSICO MACROSCÓPICO: coloração amarelada, aspecto turvo e presença de coágulos de fibrina. EXAME MICROSCÓPICO: Total de células nucleadas = 1.950/μL. Contagem diferencial: Macrófagos 54%, Linfócitos 41% e neutrófilos 5%. EXAME MICROBIOLÓGICO: Na coloração de Gram nenhum microrganismo foi visualizado, porém leucócitos estavam presentes. ANÁLISES BIOQUÍMICAS: Sangue (proteínas totais = 6,8 g/dL; LDH = 515 U/l; glicose jejum = 75 mg/dL). Líquido (proteínas totais = 4,0 g/dL; LDH = 350 UI/L; glicose = 55 mg/dL).

Com base no exposto, responda às seguintes questões:

a) Você realizaria a contagem de células desse líquido pleural em um analisador automatizado ou em câmara de contagem? Explique.
b) Calcule a razão líquido/soro para proteinase LDH.
c) O coágulo de fibrina presente nesta amostra sugere transudato ou exsudato?
d) Com as informações fornecidas, classifique esta amostra em transudato ou exsudato.
e) Cite 4 condições conhecidas que causam esse tipo de efusão.
f) Qual é o significado da contagem diferencial e da coloração de Gram nesse caso em particular?

Respostas:

a) Câmara de contagem. A presença de coágulos é uma forte razão para não examinar líquidos nos analisadores automatizados pelo fato de poder obstruir o orifício por onde passam as células durante a contagem. A presença de bactérias também é uma causa, contudo neste caso não foram observadas bactérias.
b) Proteínas = 4,0/6,8 = 0,59.
LDH = 350 / 515 =0,68.
c) Exsudatos, haja vista frequentemente possuírem quantidades elevadas de proteínas da coagulação. A ativação do fibrinogênio provoca a formação de fibrina.
d) As duas relações, proteínas e LDH, são os mais importantes indicadores na diferenciação entre transudato e exsudato neste caso. A contagem de células nucleadas e o aspecto também são úteis, porém menos confiáveis.
e) Infecção, neoplasia, trauma e artrite reumatoide.
f) Descartam a presença de infecção bacteriana. Deve-se considerar neoplasia, artrite reumatoide ou trauma como a causa. Contudo, testes adicionais são indicados para determinar a causa exata.

Caso 3

Homem de 69 anos de idade com história de exposição ao amianto e tabagismo foi internado devido a fortes dores no peito, dispneia crescente e tosse seca. O paciente nega presença de febre. Um grande derrame pleural foi diagnosticado. Foi realizada a toracocentese e um cateter de drenagem foi colocado, sendo que 6 litros de fluido foram removidos. A análise do líquido pleural apresentou os seguintes resultados: Viscosidade aumentada, aspecto sanguinolento e turvo. A cultura para bactérias aeróbicas resultou negativa. A contagem de leucócitos foi de 7.700/ μL, com diferencial de 90% de linfócitos, 5% macrófagos e 5% de polimorfonucleares. Valores de proteínas no líquido pleural = 4,6 g/dL, glicose = 30 mg/dL e LDH = 2.250 UI/L. Os valores séricos correspondentes foram: proteínas = 6,6 g/dL, glicemia = 102 mg/dl e LDH = 1.250 UI/L. O ADA no líquido pleural foi de 5 U/l.Valores de ácido hialurônico no líquido pleural se apresentaram elevados. Na citologia oncótica foram visualizados inúmeros aglomerados celulares com núcleos arredondados, nucléolos proeminentes e hipercromáticos, multinucleações e citoplasma denso.

Com base no exposto, responda às seguintes questões:

a) Qual a hipótese diagnóstica mais provável? Por quê?
b) Se trata de um transudato ou exsudato? Por quê?
c) Qual exame deve ser solicitado para o diagnóstico definitivo?

Respostas:

a) Mesotelioma. Porque frequentemente os casos de mesotelioma estão associados à exposição ao amianto. Esse tipo de neoplasia apresenta valores elevados de ácido hialurônico. Diagnóstico citológico. Exibe caracterísitcas oncologicamente positivas para mesotelioma.
b) EXSUDATO, Contagem de leucócitos > 1.000/ μL, razão de proteínas líquido/soro > 0,5, Proteínas totais > 3 g/dL, razão de glicose líquido/soro > 0,5, Glicose < 60 mg/dL e razão LDH líquido/soro ≥ 0,6.
c) O diagnóstico conclusivo pode ser feito com a obtenção de uma biópsia do tecido afetado.

Caso 4

A pleura consiste de uma dupla membrana que envolve o pulmão e o separa da parede torácica, do diafragma e mediastino. O espaço entre as duas membranas forma a cavidade pleural, e nele está contido o líquido pleural.

Com base na interpretação dos resultados e realizando o cálculo da contagem global de leucócitos em função das células nucleadas que não são consideradas leucócitos do sangue periférico, assinale a alternativa **correta**:

a) A contagem global de leucócitos é de 200/μL, os resultados podem ser considerados normais para esse tipo de amostra, e o procedimento de aspiração do líquido pleural se chama toracentese. Esse mesmo resultado associado a um volume aumentado de líquido pleural preexistente no paciente pode caracterizar um transudato devido, por exemplo, a uma insuficiência cardíaca congestiva.

b) A contagem global de leucócitos é de 350/μL, os resultados não são normais para esse tipo de amostra, e o procedimento de aspiração do líquido pleural se chama toracentese. Chama a atenção nesse resultado a presença de células mesoteliais no líquido pleural, fato este que pode estar correlacionado, por exemplo, a um mesotelioma ou carcinoma metastático.
c) A contagem global de leucócitos é de 200/μL, os resultados não são normais para esse tipo de amostra, e o procedimento de aspiração do líquido pleural se chama paracentese. Chama a atenção nesse resultado a elevada quantidade de linfócitos, macrófagos e células mesoteliais, fato este que pode estar correlacionado, por exemplo, com infecção viral, fúngica, e até mesmo lúpus eritematoso sistêmico.
d) A contagem global de leucócitos é de 350/μL, os resultados podem ser considerados normais para esse tipo de amostra e o procedimento de aspiração do líquido pleural se chama toracentese. Esse mesmo resultado, porém desconsiderando o aspecto límpido e considerando o aspecto leitoso-esbranquiçado pode caracterizar um exsudato devido, por exemplo, a uma efusão quilosa.
e) A contagem global de leucócitos é de 200/μL, os resultados não são normais para esse tipo de amostra, e o procedimento de aspiração do líquido pleural se chama toracentese. Chama a atenção nesse resultado a elevada presença de macrófagos, fato este que pode estar correlacionado, por exemplo, a uma efusão parapneumônica seguida de abscesso pulmonar.

Resposta: a.

Caso 5

Paciente WC, 85 anos, foi submetido a uma toracocentese e, após análise bioquímica do líquido, foram detectados valores de proteínas fluido/soro superiores a 0,5, e LDH de 990 U/L, ADA de 3,0 U/L e pH inferior a 6,0. Qual o líquido colhido, qual a patologia mais provável e qual o anticoagulante utilizado para a análise do pH?

a) Líquido ascítico, tuberculose e EDTA.
b) Líquido pleural, neoplasia e Citrato.
c) Líquido pleural, ruptura do esôfago e heparina.
d) Líquido pericárdico, pancreatite e sem anticoagulante.

Resposta: c.

Caso 6

Foram obtidos os seguintes resultados de um líquido pleural de um paciente submetido a uma toracocentese: Aspecto turvo, com glicose de 30 mg/dL (glicose sérica de 155 mg/dL), proteínas de 4,6 g/dL (proteína sérica de 6,66 g/dL), ADA de 225 U/L e LDH de 2250 U/L. A contagem de leucócitos foi de 3.500/μL, e diferencial com linfocitose, foi observada a redução do número de células mesoteliais. Qual a principal hipótese diagnóstica?

a) Mesotelioma maligno
b) Derrame parapneumônico
c) Insuficiência cardíaca congestiva
d) Tuberculose

Resposta: d.

Caso 7

Com relação aos líquidos pleurais de aspecto leitoso responda:

a) Quais as principais doenças relacionadas?
b) Como diferenciar as formas quilosa e pseudoquilosa do líquido pleural?
c) Qual exame pode ser solicitado para diferenciar as formas duvidosas de líquidos pleurais leitosos?

Respostas:

a) Material quiloso de lesão de ducto torácico (trauma ou linfoma) e material pseudoquiloso de inflamação crônica.
b) A efusão quilosa apresenta valores de triglicerídeos superiores a 110 mg/dL, coloração de Sudan III fortemente positiva e valores de colesterol baixos, enquanto a pseudoquilosa possui valores de triglicerídeos inferiores a 50 mg/dL e valores de colesterol superiores a 60 mg/dL.
c) Através da demonstração de quilomícrons pela eletroforese de lipoproteínas.

Caso 8

Paciente de 7 anos foi internada com dispneia, fortes dores no peito, tosse e febre. Após radiografia do tórax foi evidenciado um forte derrame pleural. Foi indicada uma toracentese para análise do líquido pleural, que apresentou as seguintes características: líquido purulento, Glicose < 40 mg/dL; pH < 7,2 e DHL > 1.000 UI/L. Pela bacterioscopia foi evidenciada a presença de diplococos Gram-positivos encapsulados; presença acentuada de leucócitos com granulocitose. Qual a possível hipótese diagnóstica e conduta de tratamento?

a) Derrame parapneumônico e há necessidade de drenar.
b) Tuberculose e tratamento com antibióticos.
c) Derrame parapneumônico e não há necessidade de drenar.
d) Mesotelioma maligno e quimioterapia.

Resposta: a

■ LÍQUIDO PERITONEAL

Formação, composição, localização e funções

O peritônio é uma membrana serosa, tridimensional, constituída de fibroblastos, matriz extracelular, vasos sanguíneos e células mesoteliais sobrejacentes. Apresenta dois folhetos, que são o parietal, que reveste a cavidade abdominal, e o visceral, que reveste os órgãos. Entre esses folhetos existe uma cavidade virtual denominada cavidade peritoneal, por onde circula o líquido peritoneal ou ascítico. A cavidade peritoneal contém, aproximadamente, 50 mL de fluido, o qual se apresenta sob

a forma de um líquido transparente, amarelo-claro, estéril e viscoso, e é produzido pelas células de membrana como um ultrafiltrado do plasma. Tanto a sua produção quanto sua reabsorção dependem de vários fatores, como a permeabilidade dos capilares peritoneais, as forças hidrostáticas no sistema circulatório, a pressão oncótica do plasma e a reabsorção linfática.

A principal função do líquido peritoneal é a proteção da cavidade abdominal, banhando-a e lubrificando-a, reduzindo, assim, o atrito entre os órgãos e permitindo a movimentação destes durante o processo da digestão. Descobriram-se também importantes papéis no transporte de fluidos e células na mediação da resposta inflamatória, no reparo tecidual, na lise de depósitos de fibrina, na proteção contra microrganismos invasores, e possivelmente na disseminação tumoral. Evidências sugerem que um distúrbio de transporte de eletrólitos e fluidos na monocamada de células mesoteliais atuam como importante fator na formação de derrames peritoneais, seja por aumento da produção e/ou deficiência de remoção. O acúmulo de líquido é chamado de ascite, e esta pode ser classificada em três níveis, de acordo com a gravidade, descomplicada, complicada e ascite refratária. Juntamente com a classificação do líquido ascítico em transudato ou exsudato, a determinação do gradiente soro/ascite de albumina (GASA) é de fundamental importância para o fornecimento de subsídios para uma posterior abordagem clínica e laboratorial. Tendo em vista a correlação que se observa entre a presença de hipertensão portal e um gradiente elevado de GASA, pode-se afirmar que níveis maiores ou iguais a 1 g/dL associados a níveis de proteínas inferiores a 3,0 g/dL sugerem o diagnóstico de cirrose. Naqueles casos em que o gradiente for menor ou igual a 1,1 g/dL, com a presença de níveis proteicos elevados, deveria se pensar em doença peritoneal, e quando ambos os parâmetros estivessem acima dos níveis críticos discriminativos propostos, a hipótese seria de hipertensão portal pós-sinusoidal.

Doenças crônicas do fígado, como a cirrose, associadas à hipertensão portal são as causas mais frequentes de ascite. Outras etiologias menos comuns incluem neoplasia maligna, principalmente de ovário e mama, insuficiência cardíaca, nefropatia, tuberculose e doenças pancreáticas. Pacientes com grande derramamento de líquido ascítico podem desenvolver hérnias inguinais, umbilicais e incisionais.

O diagnóstico precoce da ascite é extremamente importante, considerando que algumas formas são benignas e possuem bons prognósticos, no entanto, outras podem se expressar de forma muito agressiva e potencialmente letais, que se não descobertas a tempo apresentam poucas chances de cura.

COLETA – PARACENTESE

A fim de se obter a confirmação etiológica da ascite, realiza-se a remoção de líquido ascítico da cavidade peritoneal por meio de um procedimento chamado paracentese. Pacientes com sintomas e suspeita de ascite têm seu diagnóstico confirmado pela ultrassonografia, que detecta volumes variados de fluido, auxiliando tanto no diagnóstico quanto na escolha do melhor local para a realização da paracentese, especialmente quando se lida com um volume pequeno de líquido ascítico. Em geral, esse procedimento é seguro, mas não isento de riscos iatrogênicos. As principais complicações são relacionadas à perfuração de órgãos abdominais, desvio da agulha do local indicado, deposição de fragmentos do cateter no local da incisão, e eventuais sangramentos. A técnica é contraindicada nos casos de pacientes inconscientes não colaborativos com o procedimento, infecções na pele, gravidez e distensão intestinal. Uma paracentese bem-sucedida deve satisfazer aos seguintes critérios: quantidade suficiente de fluido na primeira coleta, ausência de complicações, e o mínimo de desconforto ao paciente durante o procedimento.

O paciente é colocado em posição supina, com uma inclinação de 30 a 45 graus para a retirada de grandes volumes, ou em decúbito lateral para a retirada de pequenos volumes. Os locais normalmente indicados para a incisão da agulha são na linha média, 2 cm abaixo do umbigo, ou no quadrante inferior esquerdo, lateralmente ao músculo reto abdominal. A agulha é inserida na parede abdominal, com anestesia local. Após coletar uma quantidade suficiente de amostra, a agulha é retirada rapidamente, e, assim, a pele retorna à sua posição normal. Um curativo é feito no local e a amostra encaminhada para análise.

MANIPULAÇÃO, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO

Seguir as mesmas orientações descritas para o líquido pleural.

PATOLOGIAS ASSOCIADAS AO DERRAME PERITONEAL OU ASCITE – TRANSUDATOS E EXSUDATOS

Inúmeras doenças podem evoluir para uma ascite, sejam associadas à hipertensão portal, sejam associadas a alterações no próprio peritônio. Sabe-se que a doença crônica do fígado, principal causa de hipertensão portal, é responsável por cerca de 75% dos casos de ascite.

O desenvolvimento de ascite é uma alteração patológica importante para a história natural da cirrose, uma vez que está associada a mortalidade de 50% ao longo de dois anos, além de indicar a necessidade de se considerar o transplante de fígado como uma opção terapêutica. A maior parte (75%) dos pacientes que apresentam ascite possui cirrose; o restante pode ser devido a neoplasias (10%), insuficiência cardíaca congestiva (3%), tuberculose (2%), pancreatite (1%), e outras causas raras. As principais doenças causadoras de derrames peritoneais estão listadas na Tabela 17.14.

ANÁLISE FÍSICA MACROSCÓPICA

A primeira análise após a coleta é a macroscópica. O aspecto visual do derrame (límpido, hemorrágico, purulento etc.) é o critério inicial para agrupar diversas hipóteses diagnósticas e direcionar para exames específicos de análise laboratorial, além

Tabela 17.14 Principais causas de efusões peritoneais.

Transudatos	Exsudatos
Devido a um aumento na pressão hidrostática ou diminuição da pressão oncótica do plasma	Devido a um aumento da permeabilidade capilar ou diminuição da reabsorção linfática
	Infecções
Insuficiência cardíaca congestiva	Tuberculose
Cirrose hepática	Peritonite bacteriana primária
Síndrome nefrótica com hipoproteinemia	Peritonite bacteriana secundária
Metástase hepática	Síndrome de Fitz-Hugh-Curtis
Oclusão da veia porta	Aids
	Neoplasias
	Carcinoma metastático
	Carcinomatose peritonela
	Pseudomixoma
	Hepatoma
	Mesotelioma
	Linfoma
	Trauma
	Pancreatite
	Peritonite Biliar
	Efusões quilosas
	Trauma
	Linfoma
	Carcinomas
	Tuberculose
	Infestação parasitária

Fonte: Andrade Junior, 2009; Karsher e Mcpherson, 2011; Kjeldsberg e Knight, 1993.

de permitir adotar medidas terapêuticas imediatamente, como a drenagem no caso de empiema. O aspecto e a coloração devem ser anotados antes e após a centrifugação.

Fisiologicamente o líquido ascítico é transparente, amarelo-claro, estéril e viscoso, mas em alguns casos ele pode sofrer transformações, como por exemplo, apresentar turbidez devido a infecções bacterianas, coloração esverdeada em perfurações do trato gastrointestinal, pancreatite e colecistite, um aspecto leitoso que não clareia após a centrifugação em efusão quilosa ou pseudoquilosa. Um líquido macroscopicamente hemorrágico deve ser diferenciado de punção traumática, evitando, assim, erros de diagnóstico. Na punção traumática o clareamento do fluido ascítico é observado no decorrer da paracentese, enquanto na ascite hemorrágica pequenas quantidades de sangue coram aproximadamente 1 litro de líquido peritoneal de vermelho-vivo e opaco. Isso corresponde a uma contagem eritrocitária de aproximadamente 100.000/μL. A Tabela 17.15 relata as principais possibilidades de coloração e aspecto, e sua correlação com a provável etiologia.

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

As análises microbiológicas deverão ser realizadas quando existir suspeita de Peritonite Bacteriana Espontânea (PBE), sendo uma complicação frequente e grave em pacientes cirróticos com ascite. O diagnóstico é definido pela presença de 250 ou mais polimorfonucleares por mm^3 no líquido ascítico. Cultura de líquido ascítico para bactérias, de modo geral, não se faz necessária em pacientes assintomáticos.

Gram

O teste de Gram tem baixa positividade para a pesquisa de PBE, sendo de 7% a 10%. Esses valores baixos de detecção são explicados pela sensibilidade do teste de Gram, que exige 10.000 bactérias/mL para a sua positividade, enquanto na PBE ocorre densidade baixa de até uma bactéria/mL. Apesar da sua pouca sensibilidade, se múltiplas formas bacterianas forem vistas no teste de Gram, sugere fortemente a suspeita de peritonite secundária (ex.: perfuração de víscera oca, apendicite) é mais provável do que a PBE.

Tabela 17.15 Cor e aspecto do líquido peritoneal antes e após a centrifugação e o possível significado clínico.

Aspecto	Coloração pré-centrifugação	Coloração pós-centrifugação	Etiologia
Límpido	Amarelo-claro	Amarelo-claro	Transudato Cirrose
Turvo	Amarelo, branco	Amarelo	Peritonite bacteriana Pancreatite Neoplasias
Turvo	Marrom esverdeado	Marrom esverdeado	Doença do trato biliar Ruptura do intestino
Leitoso	Branco	Branco	Ascite quilosa Ascite pseudoquilosa
Hemorrágico	Vermelho	Amarelo ou xantocrômico	Trauma neoplasias Pancreatite Infarto intestinal

Fonte: Kjeldsberg e Knight, 1993.

Coloração de Ziehl

Dificilmente é positiva devido à baixa concentração do bacilo no liquido ascítico. A sensibilidade das colorações é de apenas 5% dos pacientes com peritonite tuberculosa. Deverão ser solicitadas somente se houver forte suspeita clínica.

Pesquisa de fungos

As ascites de etiologia fúngica são raras e não se costuma solicitar rotineiramente a cultura e a pesquisa direta desses agentes.

Cultura

As amostras para cultura deverão ser inoculadas na beira do leito, em frascos de hemocultura. Os frascos de hemocultura aumentam a positividade da cultura em ascites, com contagem de PMN ≥ 250 células/μL, de cerca de 50% (pelas técnicas convencionais) para 80%.

Técnicas convencionais de cultura em ágar apresentam sensibilidade de 25% a 50%, enquanto se a inoculação de líquido peritoneal for de 5 a 10 mL em frasco de hemocultura, à beira do leito há um aumento da sensibilidade de 80% a 90%.

As bactérias mais comumente isoladas são *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae e Streptococcus pneumoniae*.

As culturas para BK apresentam positividade somente em 50% dos casos, mesmo com ótimo processamento da amostra. Os exames laparoscópicos com biópsia pleural podem ser úteis nos casos em que a tuberculose é suspeita.

ANÁLISE MICROSCÓPICA DAS CÉLULAS

Seguir as mesmas orientações descritas para o líquido pleural.

Contagem global de células nucleadas

Seguir as mesmas orientações descritas para o líquido pleural.

Contagem diferencial de células nucleadas

Seguir as mesmas orientações descritas para o líquido pleural.

Celularidade encontrada no líquido peritoneal

Os tipos celulares encontrados no líquido peritoneal incluem leucócitos, macrófagos, células mesoteliais e células metastáticas de tumores sólidos. Dentre os leucócitos estão incluídos neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, linfócitos, plasmócitos, granulócitos imaturos e blastos. Embora a morfologia dessas células nos líquidos serosos seja similar à encontrada no sangue periférico e na medula óssea, as mudanças morfológicas em decorrência de alterações degenerativas são mais frequentes. Microrganismos como bactérias e fungos podem ser visualizados. A Tabela 17.16 descreve os tipos celulares encontrados nos líquidos serosos.

Pesquisa de células LE no líquido peritoneal

Seguir as orientações descritas para o líquido pleural.

Tabela 17.16 Tipos celulares encontrados nos líquidos serosos.

Tipo celular
Série mieloide: neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos Neutrófilos degenerados: cariorréxis e cariopicnose
Série eritroide: eritrócitos, equinócitos e eritroblastos
Série linfoide: linfócitos, linfócitos atípicos, plasmócitos
Série de fagócitos mononucleares: monócitos, macrófagos, *signet cell*, eritrófagos, neutrófagos, lipófagos, siderófagos, hematoidinófagos
Células mesoteliais
Células neoplásicas: blastos, células de linfoma, células neoplásicas não hematológicas

Fonte: CLSI, 2005.

Diferenciação de transudato e exsudato

Os critérios laboratoriais para diferenciar em transudatos e exsudatos os líquidos peritoneais ainda não são bem definidos como no liquido pleural. É comum que amostras infectadas ou com neoplasias tenham concentrações de proteínas na faixa de transudato e pacientes com cirrose ou insuficiência cardíaca com proteínas na faixa de exsudato.

O gradiente de albumina soro - ascite (GASA) (Quadro 17.1), que é a subtração entre a albumina do soro e a do líquido de ascite, caracteriza melhor a ascite do que o conceito de transudato/exsudato baseado na dosagem de proteína total do líquido ascítico. A Tabela 17.17 mostra a classificação da ascite quanto ao GASA.

Quadro 17.1 Gradiente de albumina no soro – ascite (GASA).

Gasa = albumina (soro) – albumina (líquido ascítico)
Gasa ≥ 1,1 g/dL → Transudato → Hipertensão portal (valor preditivo positivo (97%)
Gasa < 1,1 g/dL → Exsudato → Outras causas de ascite

Fonte: Lopes, 2006.

Exemplo:

- albumina soro = 3,50 g/dL
- albumina líquido ascítico = 0,70 g/dL
- Gasa = 3,50 – 0,70 = 2,80 g/dL (≥ 1,1 g/dL → transudato)

Tabela 17.17 Classificação da ascite quanto ao GASA (Gradiente Albumina Soro – ascite).

Gasa elevado ≥ 1,1 g/dl = transudato (Pressão hidrostática aumentada ou pressão oncótica plasmática diminuída) ***Hipertensão portal*** Cirrose Hepatite alcoólica Ascite cardíaca Insuficiência hepática grave Síndrome de Budd-Chiari Trombose de veia porta Doença hepática veno-oclusiva
Gasa baixo < 1,1 g/dL = exsudato (Permeabilidade capilar aumentada ou reabsorção linfática diminuída) ***Doença peritoneal*** Carcinomatose peritoneal Peritonite tuberculosa Peritonite bacteriana Ascite pancreática Ascite biliar Síndrome nefrônica Doença do colágeno

Fonte: Xavier *et al.*, 2005.

As análises citológica e físico-química do líquido peritoneal permitem a diferenciação entre transudato e exsudato, indispensáveis para definir a etiologia do derrame. As Tabelas 17.6 e 17.7 (líquido pleural) mostram os valores que caracterizam a amostra como transudato ou exsudato (ver líquido pleural).

ANÁLISE BIOQUÍMICA

Proteínas

Convencionalmente, o tipo de ascite é dividido em exsudatos e transudatos, em que a concentração de proteína ascítica é $\geq$ 2,5 g/dL ou < 2,5 g/dL, respectivamente. O propósito dessa subdivisão é ajudar a identificar a causa da ascite. Assim, "doença maligna classicamente provoca uma ascite exsudativa e cirrose provoca um transudato". No entanto, há muitos equívocos na prática clínica. Por exemplo, nas ascites transudativas, 30% dos pacientes com cirrose apresentam valores de proteínas superiores a 2,5 g/dL, e 50% dos pacientes com insuficiência cardíaca apresentam proteínas acima de 3,0 g/dL. Outro exemplo que dificulta a valorização da dosagem de proteínas totais é que 25% das neoplasias e tuberculose peritoneais apresentam proteínas abaixo de 3,0 g/dL.

O gradiente albumina-soro-ascite (GASA), como visto anteriormente, é muito superior na categorização ascite com precisão de 97%.

Pacientes com nível de proteína na ascite <1 g/dL têm alto risco de desenvolver PBE. Outro conhecimento recente indica o valor das dosagens de proteína total, glicose e LDH na ascite para diagnosticar casos duvidosos de PBE. Pacientes com contagem de neutrófilos na ascite compatível com PBE terão baixa probabilidade do diagnóstico se pelo menos dois dos três critérios seguintes estiverem presentes na ascite: a) proteína total > 1 g/dL; b) glicose < 50 mg/dL; c) LDH maior que o limite superior para o soro. Nesses casos, a possibilidade de uma peritonite secundária aumenta.

Glicose

A concentração de glicose no líquido ascítico é similar ao soro. Na PBE a concentração de glicose permanece acima de 50 mg/dL, mas em casos de peritonite secundária à perfuração intestinal, a glicose pode ser indetectável. Os níveis de glicose estão diminuídos em 30% a 60% dos casos de peritonite tuberculosa e em 50% dos pacientes com carcinoma abdominal. Sua sensibilidade e especificidade são muito baixas para terem utilidade prática.

Lactato Desidrogenase (LDH)

Os níveis de LDH nos líquidos ascíticos estéreis são geralmente 50% menores que os séricos. Podem estar elevados, com níveis superiores a 150 U/L nas peritonites bacterianas espontâneas e secundárias, na tuberculose peritoneal e nos carcinomas.

Fosfatase alcalina

Valores aumentados são observados em pacientes com perfuração gastrointestinal.

Amilase

A concentração da amilase na ascite do cirrótico não complicado é de 40 UI/L e a razão ascite/soro é de 0,4. Há duas causas clássicas para o aumento de amilase no líquido ascítico: pancreatite e perfuração intestinal. Qualquer segmento do intestino pode liberar amilase quando perfurado, com exceção da vesícula biliar. Na pancreatite aguda, os níveis em geral são maiores que 10.000 U/L.

pH

Pode ser útil na diferenciação da peritonite bacteriana espontânea em pacientes com ascite com cirrose, se for utilizado em conjunto com contagem leucocitária. Um pH abaixo de 7,32 apresenta especificidade de 90% para PBE. Valores de pH baixo também são observados com ascite maligna e pancreática.

Bilirrubinas

Devem ser solicitadas a pacientes com líquidos ascíticos de coloração marrom-escuro. Valores acima de 6,0 mg/dL sugerem perfuração biliar ou intestinal alta.

Lipídios

A dosagem de triglicérides deve ser solicitada quando o líquido ascítico for leitoso. Na ascite quilosa o nível de triglicérides é maior que 200 mg/dL, podendo atingir valores maiores que 1.000 mg/dL. O colesterol dever ser solicitado se houver suspeita de ascite neoplásica, onde encontramos valores superiores a 50 mg/dL.

Marcadores tumorais

São raramente necessários para o diagnóstico de carcinoma, mas possuem algum valor prático no acompanhamento da resposta do paciente à terapia. O antígeno carcinoembriogênico utilizando uma linha de corte de 3,0 ng/mL apresenta especificidade de quase 100% para ascite maligna de origem gastrointestinal, e o CA-125 apresenta níveis, no líquido ascito, extremamente elevados, produzidos por carcinomas epiteliais de ovário.

Adenosina Deaminase (ADA)

Os níveis encontram-se aumentados na peritonite tuberculosa. A sensibilidade e especificidade da dosagem de ADA na ascite tuberculosa são de 100% e 97%, respectivamente, utilizando-se como corte o valor de 33 UI/L. Entretanto, a sensibilidade da determinação da ADA na ascite cai cerca de 30% em pacientes com cirrose (devido à pior imunidade humoral e celular). Portanto, a ADA tem maior utilidade para o diagnóstico de peritonite tuberculosa em pacientes não cirróticos. O diagnóstico de peritonite tuberculosa deve

ser considerado em todos os pacientes que apresentam ascite linfocítica inexplicada, com o GASA < 1.1 g/dL.

A Tabela 17.18 traz um resumo dos exames laboratoriais do líquido ascético.

Tabela 17.18 Exames laboratoriais do líquido ascítico.

Realizados de rotina	
Contagem total de células com diferencial	
Proteínas totais e albumina.	
Gradiente GASA	
Cultura em frascos de hemocultura	
Realizados a depender do quadro clínico	
Glicose	ADA
LDH	Esfregaço e cultura para BK
Fosfatase alcalina	Citologia oncótica
CEA	Triglicerídios
Amilase	Bilirrubinas
Baixa utilidade	
pH	Fibronectina
Lactato	α-1-antitripsina
Colesterol	

Fonte: Runyon, 1992.

CASOS CLÍNICOS

Caso 1

Um paciente chega ao pronto-socorro e o médico solicita uma paracentese de emergência. O paciente não apresentava nenhum sinal de ascite. A contagem de eritrócitos foi de 500.000/μL. Qual a situação que melhor indica o caso:

a) Trauma com hemorragia abdominal
b) Tuberculose
c) Punção traumática
d) Neoplasia

Resposta: a

Caso 2

A infecção do líquido ascítico é muito comum em pacientes cirróticos com ascite, justificando a realização de paracentese diagnóstica na admissão desses pacientes. O diagnóstico da Peritonite Bacteriana Espontânea (PBE) é definido?

a) Presença de Macrófagos acima de 500/mm^3.
b) Presença de 250 ou mais polimorfonucleares/mm^3.
c) Somente pelo resultado da cultura positiva para bactérias aeróbias.
d) Pela dosagem da glicose elevada nessa situação.

Resposta: b

Caso 3

Quais os principais exames que devem ser solicitados no líquido ascítico em pacientes com suspeita de perfuração gastrointestinal?

a) Glicose e albumina
b) Determinar o GASA e LDH
c) Amilase e fosfatase alcalina
d) CA-125

Resposta: c

Caso 4

Paciente alcoolista foi internado por apresentar progressivo aumento do volume abdominal, urina escura, olhos amarelados e dispneia aos esforços. Após paracentese foram encontrados os seguintes resultados no líquido peritoneal: Aspecto límpido, amarelo pálido, albumina no fluido 0,9 g/dL, albumina soro 3,0 g/dL, GASA = 2,1, cultura e bacterioscopia foram negativas. A celularidade do fluido apresentou 50 leucócitos/mm^3. Trata-se de um?

a) Transudato, GASA acima de 1,1 g/dL, hipertensão portal
b) Transudato, GASA acima de 1,1 g/dL, peritonite tuberculosa
c) Exsudato, GASA baixo de 1,1 g/dL, hipertensão portal
d) Exsudato, GASA baixo de 1,1 g/dL, aumento da permeabilidade capilar

Resposta: a

Caso 5

Com relação ao significado dos testes no fluido peritoneal, marque a alternativa correspondente:

a) Neoplasia de origem ovariana	( ) CEA
a) Peritonite tuberculosa	( ) Glicose diminuida
a) Pancreatite	( ) Creatinina aumentada
a) Neoplasia de origem gastrintestinal	( ) Amilase elevada
a) Ruptura de bexiga	( ) CA-125 elevado

Resposta: d, b, e, c, a

Caso 6

Após paracentese encontramos os seguintes resultados: Leucócitos 2.950/mm^3, com 80% de polimorfonucleares; Albumina soro = 3,8 g/dL; albumina fluido = 3,3 g/dL; GASA = 0,5. Com base nessas informações podemos afirmar que as seguintes hipóteses diagnósticas são possíveis, exceto:

a) Peritonite bacteriana espontânea
b) Carcinomatose peritoneal
c) Hepatite alcoólica
d) Peritonite bacteriana secundária

Resposta: c

Caso 7

Homem alcoolista de 45 anos, uma semana após queda da própria altura, procurou pronto-socorro com queixa de dor abdominal difusa, associada a náuseas, com piora progressiva. Referia aumento progressivo do volume abdominal, anorexia, oligúria e um episódio de hematúria. Negava febre. A tomografia não revelou sinais de hepatopatia. Uma paracentese foi indicada. O exame de urina indicou leucocitúria acima de 5 milhões/mL e hematúria de 250.000/mL. A paracentese mostrou coloração clara, albumina de 0,6 g/dL (gradiente soro-ascite de albumina (GASA) = 4,0 g.dL), 65 células/mm^3 com predomínio linfomononuclear, DHL = 55 U/L, glicose = 105 mg/dL, ADA = 2,6 U/L; foi encontrada elevada concentração de creatinina e ureia no líquido ascítico. A coloração de Gram, a pesquisa de bacilo álcool-ácido resistente e as culturas foram todas negativas. Com base nessas informações, responda:

a) Qual é a provável patologia envolvida nessa situação? Justifique?
b) Interprete os valores encontrados no líquido ascítico que favorecem tal diagnóstico?
c) Quais exames podem ser solicitados para confirmar o diagnóstico?

Resposta:

a) Rotura da parede vesical (uroascite). A maioria das roturas da bexiga é de origem traumática, incluindo trauma abdominal relacionado a procedimentos urológicos ou obstétricos, uso de cateteres de longa permanência e dispositivos intrauterinos.
b) O gradiente entre a albumina do líquido ascítico e do soro (GASA) > 1,1 (falsa hipertensão portal devido à ausência de alterações hepáticas) e concentrações de ureia e creatinina muito elevadas no fluido alertando para o diagnóstico de uroascite.
c) O diagnóstico na maioria dos casos é confirmado por cistografia retrógrada ou tomografia abdominal. O ultrassom abdominal com doppler e a cistografia contrastada convencional podem também auxiliar no diagnóstico.

LÍQUIDO PERICÁRDICO

Formação, composição, localização e funções

O pericárdio é formado por duas membranas: uma membrana serosa visceral, que é intimamente aderida ao coração, gordura epicárdica, e uma membrana parietal fibrosa. O pericárdio é composto de componentes elásticos, vasculares, fibrosos, linfáticos e mesoteliais. O pericárdio envolve a maior parte da superfície do coração, tanto as porções justacardiais das veias pulmonares e sistêmicas como os segmentos proximais dos grandes vasos. Uma porção significativa do átrio esquerdo, no entanto, não está contida dentro do pericárdio. O pericárdio é preso por ligamentos ao manúbrio, processo xifoide, coluna vertebral e tendão central do diafragma, o que limita o deslocamento do coração. O pericárdio não é essencial para manter a vida ou a saúde de uma pessoa em termos de manutenção da função cardíaca, mesmo que esteja ausente devido a fatores genéticos ou que seja removido cirurgicamente. Contudo, o pericárdio desempenha um papel na função cardiovascular normal e pode estar envolvido em doenças importantes. As funções normais do pericárdio incluem a manutenção do formato cardíaco ótimo, promoção de interações entre as câmaras cardíacas, evitando o extravasamento do coração, redução da fricção entre os batimentos cardíacos e as estruturas adjacentes, formação de uma barreira física à infecção e limitação do deslocamento do coração durante o ciclo cardíaco.

O espaço entre o pericárdio parietal e visceral contém normalmente 15 a 50 mL de fluido, e o volume de reserva do pericárdio é relativamente pequeno. Uma vez que todo o voume do pericárdio é preenchido, a pressão intrapericárdica aumenta significativamente com a adição de mais fluido. Deve-se notar que, com volume significativo de fluido no espaço pericárdico, o líquido preenche os cateteres prejudicando medições precisas de pressão intrapericárdica.

Não há valores de referência definidos para o líquido pericárdico, e a presença desse fluido com significância clínica já é considerada anormal.

COLETA – PERICARDIOCENTESE

O procedimento de coleta do líquido pericárdico é chamado de pericardiocentese. O acúmulo de líquido na cavidade pericárdica é mais frequentemente causado por danos no pericárdio, associados com mudanças na permeabilidade das membranas devido a infecções (pericardite), neoplasias ou uremia. Na pericardite aguda um exsudato fibrinoso interfere na drenagem do líquido pericárdico e predispõe o paciente a efusão. Alternativamente, a coleta de líquido pericárdico pode ser realizada por pericardiotomia, na qual se cria uma janela pericárdica em decorrência de uma toracotomia limitada. As opiniões variam sobre qual dos dois procedimentos citados deve ser usado para estudos diagnósticos. Alguns centros realizam pericardiocentese apenas em situações de emergência, em virtude da potencial morbidade associada a este procedimento.

MANIPULAÇÃO, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO

Seguir as mesmas orientações descritas para o líquido pleural.

PATOLOGIAS ASSOCIADAS AO DERRAME PERICÁRDICO

A etiologia das efusões pericárdicas inclui infecções, infarto do miocárdio, trauma por cirurgia ou ferida, neoplasias, radiação e causas idiopáticas. As infecções mais comuns são as virais, incluindo ecoviroses, vírus *Coxsackie* e adenovírus. As

efusões agudas geralmente estão associadas com dor no peito e mudanças eletrocardiográficas, podendo progredir para comprometimento hemodinâmico. Em contraste, as efusões pericárdicas crônicas podem ser assintomáticas ou se apresentarem na forma de pericardite constritiva semelhante à insuficiência cardíaca congestiva. A detecção precoce de uma efusão pericárdica é acentuada com o uso de ecocardiografia. A Tabela 17.19 mostra as principais causas de efusões pericárdicas.

Tabela 17.19 Causas de efusões pericárdicas.

Infecções
• Pericardite bacteriana • Endocardite bacteriana • Pericardite viral • Pericardite por micoplasma • Tuberculose • Pericardite fúngica
Doença cardiovascular
Infarto do miocárdio Síndrome pós-infarto Ruptura cardíaca Dissecção aórtica Insuficiência cardíaca congestiva
Neoplasias
Carcinoma metastático Mesotelioma Linfoma, leucemia
Trauma
Doenças metabólicas
Uremia Mixedema
Doença vascular do colágeno
Coagulopatias, uso de terapia anticoagulante

Fonte: Kjeldsberg e Knight, 1993.

ANÁLISE FÍSICA MACROSCÓPICA

A aparência física do líquido pericárdico possui pouco valor diagnóstico. O fluido aparece seroso em aproximadamente 33% dos casos, e hemorrágico no restante. Assim como nos demais fluidos serosos, os estudos iniciais devem estabelecer se a efusão é um transudato ou exsudato. Os transudatos são classicamente descritos como fluidos aquosos, de cor amarelo-claro, e que não apresentam coágulos. Estão associados com insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática e síndrome nefrótica. Os exsudatos são geralmente descritos como fluidos turvos e purulentos, contendo coágulos de fibrina. São associados com infecções e neoplasias. Derrames macroscopicamente sanguinolentos estão associados à punção cardíaca acidental e ao uso indevido de anticoagulantes. Mais raramente, efusões quilosas e pseudoquilosas podem estar presentes. A Tabela 17.20 descreve os significados dos principais testes realizados no líquido pericárdico.

Tabela 17.20 Significados dos testes no líquido pericárdico.

Aspecto	
Teste	**Significado**
Claro, amarelo-pálido	Normal, transudato
Laivos de sangue	Infecção, neoplasia
Sanguinolenta (macroscopicamente)	Punção cardíaca, anticoagulação
Leitoso	Material quiloso e pseudoquiloso
Diferencial	
Teste	**Significado**
Neutrófilos aumentados	Endocardite bacteriana
Células neoplásicas	Carcinoma metastático
Antígeno carcinoembriogênico	Carcinoma metastático
Gram e cultura positivas	Endocardite bacteriana
BAAR positiva	Efusão tuberculosa
Adenosina deaminase	Efusão tuberculosa

Fonte: Strasinger e Di Lorenzo, 2009.

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Se houver suspeita de infecção, uma pequena amostra do líquido pericárdico (2 a 3 mL) deverá ser enviada ao laboratório, para cultura (semear em frascos de hemocultura), Gram, pesquisa de fungos e pesquisa de BK em tubo estéril. O material deve ser encaminhado até 2 horas após a coleta, em temperatura ambiente (Tabela 17.21).

Tabela 17.21 Principais agentes encontrados nos derrames pericárdicos.

Viral	*Coxsackie*, ECHO, *Influenza*, EPB, Parotidite, Varicela-zóster, CMV
Bacteriana	Estafilococos, Pneumococos, Estreptococos, *Haemophilus,* Meningococos, Micobactérias, Bacilos Gram-negativos e Bactérias Anaeróbias
Fúngica	*Histoplasma*, *Blastomyces, Nocardia, Aspergillus, Candida*
Parasitária	Toxoplasma, *Trypanosoma*, *Echinococcus*

Fonte: Munir Ebaid *et al.*, 2000.

ANÁLISE MICROSCÓPICA DAS CÉLULAS

Seguir as mesmas orientações descritas para o líquido pleural.

Contagem global de células nucleadas

Seguir as mesmas orientações descritas para o líquido pleural.

Contagem diferencial de células nucleadas

Seguir as mesmas orientações descritas para o líquido pleural.

Celularidade encontrada no líquido pericárdico

Seguir as mesmas orientações descritas para o líquido pleural.

Pesquisa de células LE no líquido pericárdico

Seguir as mesmas orientações descritas para o líquido pleural.

DIFERENCIAÇÃO DE TRANSUDATOS E EXSUDATOS

Seguir as mesmas orientações descritas para o líquido pleural.

ANÁLISE BIOQUÍMICA

Para a análise do líquido pericárdico devemos usar os mesmos critérios para diferenciação entre transudatos e exsudatos utilizados para derrame pleural. Ver Tabelas 17.6 e 17.7 (Líquido pleural). A distinção entre exsudato e transudato é baseada em critérios de Light. A proporção de proteína do fluido/soro superior a 0,5, de um fluido/soro de LDH superior a 0,6, e uma concentração de LDH de fluido maior do que 220 U/l é indicativo de exsudado. Se o conteúdo de proteína total no fluido é maior do que 3,0 g/dL, a sensibilidade é de 97%, e se a relação de proteína do fluido/soro é maior do que 0,5, a sensibilidade é de 96%. Um nível de LDH superior a 220 U/L é de 98% de sensibilidade para o exsudado, e os níveis de fluido/ soro LDH maior do que 0,6 é de 94% de sensibilidade para o exsudado.

Valores de glicose diminuídos a menos de 40 mg/dL podem estar presentes nos exsudatos causados por infecções bacterianas, tuberculosas, reumáticas ou malignas, entretanto a glicose possui pouco valor prático no diagnóstico diferencial.

A dosagem de ADA no líquido pericárdico possui sensibilidade de 71% a 100%, e a especificidade de 91% a 100% para efusões tuberculosas, com valores de corte semelhantes aos utilizados no derrame pleural, superiores a 40 U/L.

CASOS CLÍNICOS

Caso 1

Um homem de 30 anos, queixando-se de dispneia progressiva e dor no peito foi admitido no hospital. No exame físico, taquipneia, enchimento jugular, diminuição generalizada do murmúrio vesicular e de baixos tons, sem sopros cardíacos adicionais foram encontrados. Ele não tinha circulação colateral ou edema periférico. ECG revelou ritmo sinusal de 120 bpm, com um eixo de esquerda e baixa tensão com alternância elétrica. Radiografia de tórax mostrou aumento do coração. O ecocardiograma foi ordenado e confirmou a presença de derrame pericárdico grave, e colapso diastólico e sistólico do ventrículo direito. A pericardiocentese obteve 300 mL de um líquido turvo, cujo aspecto não foi alterado pela centrifugação. A análise bioquímica do líquido mostrou elevados níveis de colesterol (126 mg/dL), triglicerídeos (1307 mg/dL), e proteínas (6,3 g/dL). A citologia mostrou 500 células nucleadas/μL, com 90% de forma mononucleares correspondentes a linfócitos pequenos, nenhuma célula atípica estava presente, e o resultado da cultura foi negativo. Com base nessas informações, responda:

a) Qual o provável diagnóstico e quais os critérios diagnósticos confirmatórios?
a) Explique resumidamente a fisiopatologia dessa doença.

Respostas:

a) Quilopericárdio. É uma doença rara cujo diagnóstico final é determinado por pericardiocentese e análise do fluido. A aparência leitosa e a presença de gotas de gordura, vistas por microscopia ou coloração positiva para SUDAN III, são típicos. Do ponto de vista bioquímico, o quilopericárdio é caracterizado por níveis de colesterol maior do que 100 mg/dL, de triglicérides acima de 1.000 mg/dL, e os níveis de proteína acima de 3,5 g/dL, embora esses níveis sejam dependentes da dieta do paciente. As células nucleadas encontradas no fluido, em geral, não excedem 4.000/μL, com a proporção de linfócitos sendo maior ou igual a 90%. A cultura geralmente é negativa.
b) Os vasos linfáticos do pericárdio drenam o fluido pericárdico em direção ao mediastino anterior e linfonodos broncopulmonares, e, finalmente, para o ducto torácico. Este é o principal percurso em situações normais. Contudo, existem outras rotas diafragmáticas e intercostais. Condições que prejudiquem a drenagem podem causar quilopericárdio. Devido a válvulas em vasos linfáticos, o refluxo de líquido não acontece, a menos que a pressão seja maior que 15 cm de água. Portanto, a obstrução mecânica da drenagem venosa desempenha um papel fundamental na fisiopatologia do quilopericárdio.

Caso 2

Paciente com 9 anos, há 7 dias com dor torácica que irradiava a região epigástrica, cita febre constante, turgência jugular (veias distendidas do pescoço), hipotensão, cianose e pulso paradoxal. Após eletrocardiograma foi detectado um

derrame pericárdico de grau acentuado. Paciente foi submetida a uma pericardiocentese, com obtenção de efusão piosanguinolenta, glicose inferior a 10 mg/dL, LDH superior a 1.000 U/L, ADA inferior a 5 U/L, e proteínas totais superior a 4,5 g/dL. Contagem de leucócitos superior a 1.000/μL, com diferencial 90% polimorfonucleares.

a) Com base nos resultados laboratoriais, esse fluido deve ser considerado um transudato ou exsudato?
b) Qual a causa mais provável do derrame? Quais os principais agentes envolvidos?
c) Quais exames laboratoriais podem ser solicitados para confirmação diagnóstica?

Respostas:

a) Exsudato
b) Pericardite bacteriana. *Stapthylococcus, Streptococcus* e *Haemophilus*
c) Bacterioscopia e cultura para bactérias aeróbias e anaeróbias.

ASPECTOS IMPORTANTES DOS LÍQUIDOS SEROSOS

Detecção de células malignas nos líquidos serosos

As células malignas ou neoplásicas encontradas nos líquidos serosos exibem características citológicas que variam conforme o modo de preparo e coloração utilizados para a sua avaliação. De modo geral, células com características de malignidade apresentam elevada relação núcleo/citoplasma, contorno nuclear irregular, anormalidades na cromatina e nucléolos proeminentes. Ainda podem ser visualizadas figuras de mitose, agrupamentos e configurações celulares anormais. No citoplasma pode ser visualizada queratinização (*Papanicolaou*) e inclusões anormais. As células malignas podem ter aparência monótona ou demonstrar um marcado pleomorfismo, com grandes variações de tamanho e forma. Colorações do tipo *Romanowsky*, como a de *May Grünwal & Giemsa* são particularmente úteis nas neoplasias hematológicas e são utilizadas na triagem de amostras para determinar se uma porção deve ser enviada ao serviço de citometria de fluxo para avaliação. Também são úteis para determinar se uma amostra deve ser enviada ao laboratório de citologia/anatomia patológica para coloração de *Papanicolaou* e preparo de blocos celulares quando neoplasias não hematológicas são a suspeita principal.

O achado de células neoplásicas nas efusões serosas está associado a uma significativa implicação terapêutica e prognóstica. As células malignas nos derrames são frequentemente encontradas entre os macrófagos e populações de células mesoteliais. Além disso, as células mesoteliais podem se tornar reativas mediante uma ampla variedade de estímulos, os quais podem provocar alterações nucleares e citoplasmáticas que se assemelham às células malignas. Essas alterações podem ser ainda mais acentuadas após radioterapia ou quimioterapia. Frente a essas implicações clínicas, o diagnóstico preciso desta condição é de fundamental importância.

AUTOMAÇÃO DOS LÍQUIDOS SEROSOS

Os analisadores automatizados de última geração, tanto hematológicos quanto de urinálise, oferecem ao laboratório, no que se refere à análise de líquidos biológicos, uma alternativa para ampliar a precisão e a exatidão dos resultados, principalmente por contarem mais células do que os métodos manuais. Embora a variação observada nos analisadores automatizados, em contagens baixas, seja elevada, ainda é bem menor que a observada nas contagens manuais. Atualmente, já estão disponíveis no mercado vários analisadores que realizam a contagem de células nos líquidos biológicos, tais como: o XE-5000 (*Sysmex,* Kobe, Japão), Advia 2120i (*Siemens Diagnostics,* New York, EUA) e o IQ200 (*Iris Diagnostics, Chatsworth,* EUA). Dependendo do analisador, a tecnologia incorporada pode incluir a impedância elétrica, citometria de fluxo, dispersão da luz *laser* e fluorescente, citoquímica seguida de absorção e dispersão da luz, análise digital de imagens, e até mesmo a combinação dessas metodologias. Os fabricantes de cada analisador devem informar quais tipos de líquidos biológicos possuem aprovação por agência regulatória, como Anvisa e FDA, para serem analisados, e os usuários devem seguir rigorosamente essas recomendações.

Na utilização da automação para líquidos biológicos é imprescindível assegurar que os analisadores forneçam contagens confiáveis, especialmente em amostras de baixa celularidade. Desta forma, cada laboratório deve definir os limites inferior e superior para contagem de células nucleadas e eritrócitos, abaixo ou acima dos quais o uso dos analisadores não é confiável, ressaltando que esses limites não devem ser inferiores ou superiores aos recomendados pelos fabricantes. Uma vez que um laboratório estabelece diretrizes para se considerar uma amostra de líquido biológico aceitável, para ser analisada por métodos automatizados, devem-se formular métodos reflexivos para as amostras, com contagens abaixo ou acima de certos limites, e com presença de alertas morfológicos.

Portanto, o laboratório deve indicar um método alternativo para verificar as contagens baixas (ex.: contagem em câmaras) e as contagens altas (ex.: diluição da amostra para a mesma entrar na faixa de linearidade do analisador). Ademais, também deve indicar as situações em que será necessária a contagem diferencial manual das células nucleadas (ex.: alertas morfológicos fornecidos pelos analisadores nos módulos para líquidos biológicos). Muito cuidado deve ser tomado no intuito de identificar amostras como partículas

semelhantes às células e que possam elevar falsamente as contagens automatizadas ou obstruir o orifício do analisador automatizado.

Como reportar os resultados

Os resultados reportados pelo laboratório devem descrever o tipo de amostra analisada, de acordo com o sítio anatômico, isto é, pleural, peritoneal ou pericárdico. No caso do líquido pleural, o lado direito ou esquerdo deve ser mencionado. No laudo devem estar inclusas anotações sobre a cor, o aspecto e a presença ou ausência de coágulos no líquido analisado. As contagens globais devem incluir o total de células nucleadas e o total de eritrócitos. O termo contagem de células nucleadas é mais adequado do que contagem de leucócitos, uma vez que o primeiro é mais inclusivo, levando-se em conta os tipos celulares observados nos líquidos. Nas contagens manuais em câmara, não é possível fazer a diferenciação entre macrófagos e células mesoteliais e, considerando que nem todos os laboratórios concordam em classificar macrófagos como leucócitos, o termo contagem de células nucleadas é o preferido. Opcionalmente, pode-se liberar a contagem global de leucócitos após fazer a correção das mesmas, em função do número de células mesoteliais e macrófagos obtidos na contagem diferencial. As unidades das determinações devem ser padronizadas entre as do SI ou unidades convencionais (células/μL) e, de preferência, serem iguais às usadas por suas contrapartidas do sangue periférico.

A contagem diferencial deve incluir todos os tipos celulares encontrados nos líquidos, e estes devem ser reportados na forma de porcentagem. Deve-se evitar reportar os resultados da contagem diferencial na forma de mononucleares e polimorfonucleares, pelo fato de tipos celulares como células mesoteliais e eosinófilos possuírem valor preditivo em determinadas doenças. Os valores absolutos das contagens possuem valor limitado. Não é necessário fazer a distinção entre neutrófilos segmentados e bastonetes. Os monócitos e os macrófagos podem ser contados na mesma categoria, uma vez que as formas intermediárias causam dificuldades na exata classificação dessas células. Além disso, classificar separadamente monócitos e macrófagos não atende nenhum propósito médico. Os autores sugerem colocar no laudo o termo macrófagos ao invés de monócitos, uma vez que os monócitos que saem do sangue periférico e entram nos tecidos passam a se chamar macrófagos.

Células neoplásicas de tumores sólidos e de tumores hematológicos devem ser reconhecidas e reportadas após a confirmação por pessoal qualificado para identificar e classificar células malignas. Deve sempre haver cooperação entre o laboratório de hematologia e o de citologia/anatomia patológica no sentido de correlacionar os resultados para fornecer um diagnóstico mais exato. Uma seção de comentários pode ser adicionada nos laudos para incluir achados morfológicos adicionais e com significado clínico relevante. Caso o laboratório esteja ciente da suspeita clínica de neoplasias, torna-se útil emitir comentários sobre a presença ou ausência de células malignas. Contudo, é importante compreender que as contagens diferenciais em líquidos serosos não são apropriadas para rastrear ou diagnosticar neoplasias em pacientes previamente não diagnosticados. Quando uma contagem diferencial não puder ser reportada, a seção comentários deve incluir um descritivo a respeito da composição celular observada ou das causas que impossibilitaram a realização do procedimento.

Outros fluidos da cavidade serosa

Existem outros fluidos biológicos que não são considerados verdadeiros fluidos e, sim, fluidos estranhos, que são introduzidos na cavidade peritoneal para diagnóstico e tratamento. Dentre esses fluidos estão incluídos o lavado peritoneal e o líquido de diálise peritoneal ambulatorial contínua. Ambos são enviados ao laboratório para avaliação das contagens globais e diferenciais de células, assim como para proceder às culturas microbiológicas. O lavado peritoneal é normalmente utilizado em emergências para diagnosticar sangramento intra-abdominal decorrente, principalmente, de perfuração intestinal. As amostras em geral são enviadas ao laboratório somente para o exame citológico. A diálise peritoneal contínua é utilizada para tratar pacientes com insuficiência renal crônica e o fluido obtido da diálise é avaliado quanto ao total de células nucleadas, contagem diferencial e análises microbiológicas.

CONTROLE DE QUALIDADE DOS LÍQUIDOS SEROSOS

É de fundamental importância que se faça o controle de qualidade interno das contagens em hemocitômetro, evitando, assim, qualquer interferente que altere o resultado final da contagem. Um método que pode ser utilizado é a comparação entre os resultados obtidos manualmente com os obtidos em analisadores automatizados. Para isso, pode-se diluir uma amostra de sangue total selecionada da rotina, que tenha aproximadamente 10.000 leucócitos/μL (valor obtido em contagem automatizada). No procedimento de controle de qualidade da contagem de células nucleadas, utiliza-se a câmara de Neubauer para a contagem manual, de preferência diluindo-se a amostra em líquidos hemolisante, como o de Türk e solução aquosa de fucsina para hemolisar os numerosos eritrócitos de uma amostra de sangue total. Quinzenalmente, deve-se verificar se houve contaminação dos diluentes (solução de fucsina, Türk e solução salina), examinando-os em câmara de contagem com aumento de 40×. Os diluentes contaminados com partículas ou fungos devem ser descartados, e novas soluções devem ser preparadas. Semestralmente,

deve-se verificar a velocidade e o tempo de citocentrifugação, e para isso deve-se chamar a assistência técnica da citocentrífuga.

Para garantir a qualidade das contagens diferenciais de células nucleadas, pode-se fazer comparações interobservadores em um mesmo laboratório e a adesão do laboratório a programas de avaliação externa da qualidade, que realizem a análise de líquidos serosos ou, ainda, fazer comparações interlaboratoriais locais ou regionais.

As amostras de líquidos serosos são de difícil obtenção, portanto somente pessoal devidamente treinado deve realizar as análises de modo a assegurar consistência, previsibilidade e resultados de alta qualidade. Ainda pelo fato de essas amostras poderem chegar ao laboratório a qualquer momento do dia ou da noite, torna-se importante garantir que todos os membros da equipe laboratorial sejam adequadamente treinados para realizar tal tarefa.

BIOSSEGURANÇA

Os líquidos serosos são amostras contaminantes, portanto devem ser manipuladas com a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI's), como avental ou jaleco longo, de mangas compridas e de punho retrátil, luvas descartáveis, óculos de proteção, pipetadores manuais ou automáticos e, quando for o caso, protetor facial. Previamente ao procedimento de centrifugação das amostras para concentração de células, deve-se tampar os tubos para evitar a formação de aerossóis.

OUTROS MÉTODOS DE ANÁLISE DE LÍQUIDOS SEROSOS

Quando uma população de células malignas é identificada em uma amostra de líquido seroso, a mesma pode representar tanto uma neoplasia primária do sítio de origem ou do mesotélio adjacente, como neoplasias hematológicas ou metástases de outros órgãos. Os painéis de imunocitoquímica podem ser utilizados para classificação dos tumores, dependendo do aspecto morfológico observado nas preparações. A citometria de fluxo é muito útil no diagnóstico de neoplasias hematológicas que envolvem as cavidades serosas e possui grande sensibilidade para classificar tumores, contudo um número suficiente de células deve estar presente na amostra analisada. Estudos moleculares podem identificar algumas leucemias e linfomas, e podem também ser utilizados para identificar microrganismos nos líquidos serosos. A Tabela 17.22 resume as principais características das diferentes técnicas complementares para identificar malignidade nos líquidos serosos. A sensata aplicação dessas técnicas é necessária tanto para aumentar a acurácia diagnóstica como para a tomada de decisões. Muitas dessas técnicas ainda estão em níveis experimentais, embora sejam bastante promissoras.

Tabela 17.22 Características mais importantes dos diferentes testes complementares para diagnosticar malignidade em líquidos serosos.

Teste complementar	Características
Imunocitoquímica	• Comumente utilizado • Necessita de um painel de anticorpos • Possui alta sensibilidade e especificidade • Boa relação custo-benefício
Microscopia eletrônica	• Dispendioso • Morosa • Útil na distinção entre mesotelioma e adenocarcinoma
Região nucleolar organizadora argirofílica (AgNOR) Essa técnica detecta proteínas nucleolares utilizando um método de coloração com a prata	• Simples e fácil de fazer • Econômico • Possui grande valor potencial

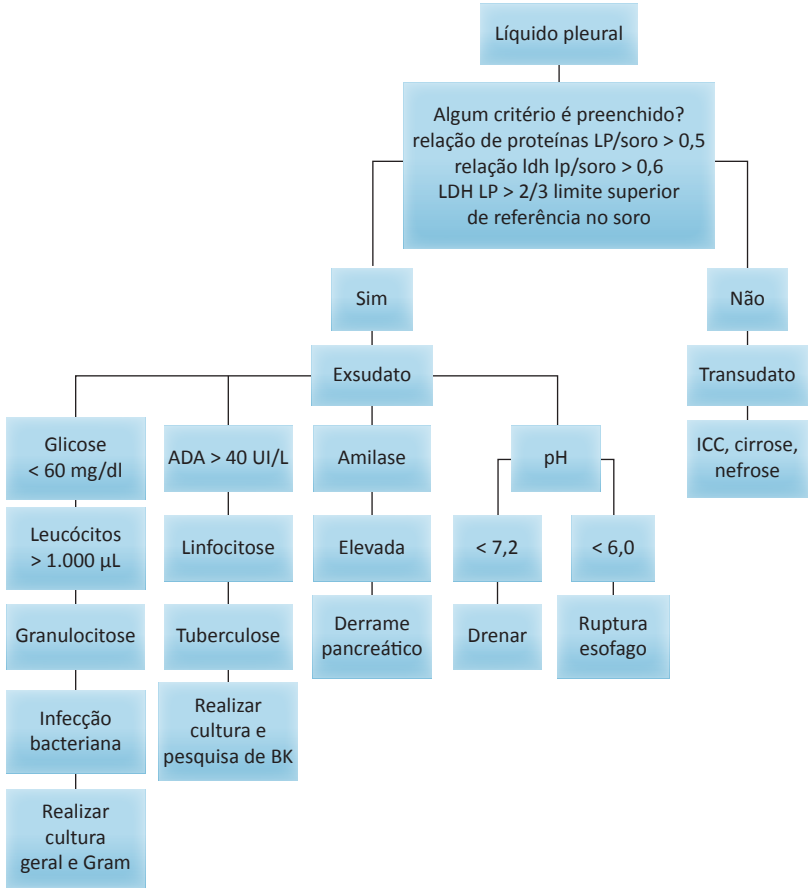
(*Continua*)

Tabela 17.22 Características mais importantes dos diferentes testes complementares para diagnosticar malignidade em líquidos serosos. (*Continuação*)

Teste complementar	Características
Citometria de fluxo	• Dispendioso • Sensibilidade variável • Citometria de fluxo com duas ou mais cores possui maior utilidade
Citometria por imagem	• Possibilita a seleção microscópica visual das células • Demorado e tedioso • Citometria por imagem utilizando rastreamento por *laser* é mais rápida
Marcadores de proliferação celular	• Ki67 é um excelente marcador para reconhecer rapidamente populações de células em proliferação que indiquem malignidade
Marcadores tumorais	• Útil para diagnosticar vários tipos de tumores
Marcadores de metástases	• CD44v3-10 é positivo em células malignas e com alto potencial para metástases
Imunofluorescência	• A técnica de imunofluorescência com dupla coloração pode ser aplicada para determinar o conteúdo de DNA e a reatividade imunocitoquímica
Atividade da telomerase	• A demonstração da atividade da telomerase pode indicar malignidade
PCR (Reação em cadeia da polimerase)	• A detecção de EGP-2RNA por RT-PCR é específica e sensível para detectar células epiteliais malignas em efusões serosas
FISH (Hibridização *in situ* fluorescente)	• Detecta aberrações cromossômicas mínimas • Não é necessária cultura cromossômica
Fatores de crescimento	• O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), um indicador de angiogênese, está significantemente elevado em efusões neoplásicas
Antígenos de grupos sanguíneos	• Sialosil-Tn, precursor do antígeno MN, é expresso em carcinomas e em epitélios displásicos • Possui alta sensibilidade e moderada especificidade
Antígenos HLA	• Tumores metastáticos demonstram escassez de antígeno HLA-1 • Células mesoteliais reativas mostram forte positividade para HLA-1 e β_2-microglobulina
Produtos de oncogene – Proteína p53	• Mutações de p53 ocorrem frequentemente em mesoteliomas

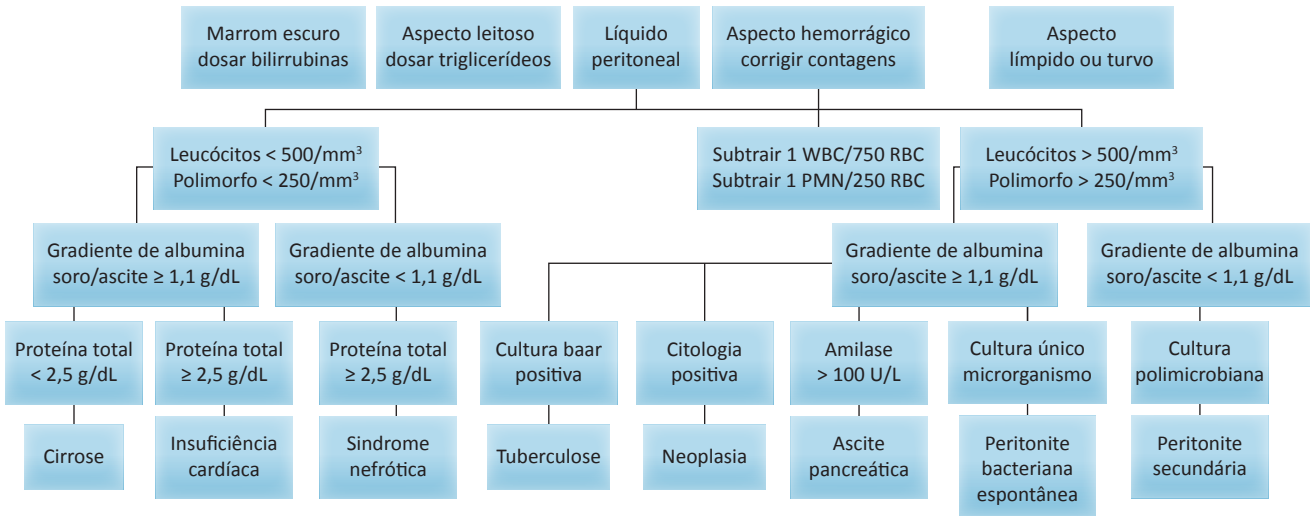
Fonte: Adaptada de Mohanty e Dey, 2003.

FLUXOGRAMA DE DIAGNÓSTICO PARA O LÍQUIDO PLEURAL



Fonte: Strasinger e Di Lorenzo, 2009; autores.

FLUXOGRAMA DIAGNÓSTICO PARA LÍQUIDO PERITONEAL



Fonte: Adaptada de Heidelbaugh e Sherbondy, 2006; Xavier *et al.*, 2005.

Seguem nas Figuras 17.3 a 17.17 imagens celulares que exemplificam algumas possibilidades de celularidade encontradas nos líquidos cavitários ou serosos, objetivando assim auxiliar no esclarecimento das dúvidas em relação à citologia.

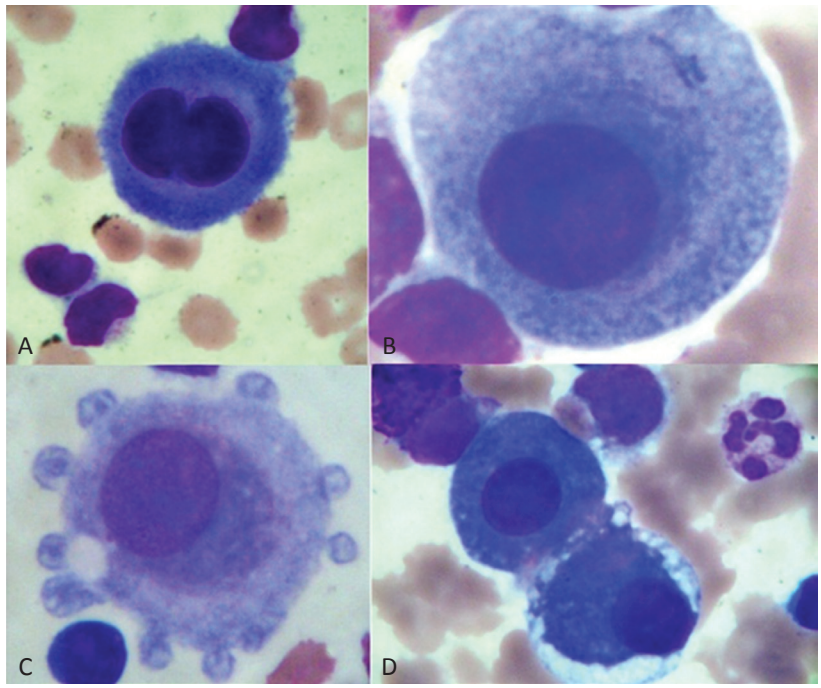


Figura 17.3 **(A)** Célula mesotelial com binucleação e linfócitos. (**B)** e **(C)** Célula mesotelial. **(D)** Células mesoteliais, neutrófilo, linfócitos e basófilo.
Fonte: Autores.

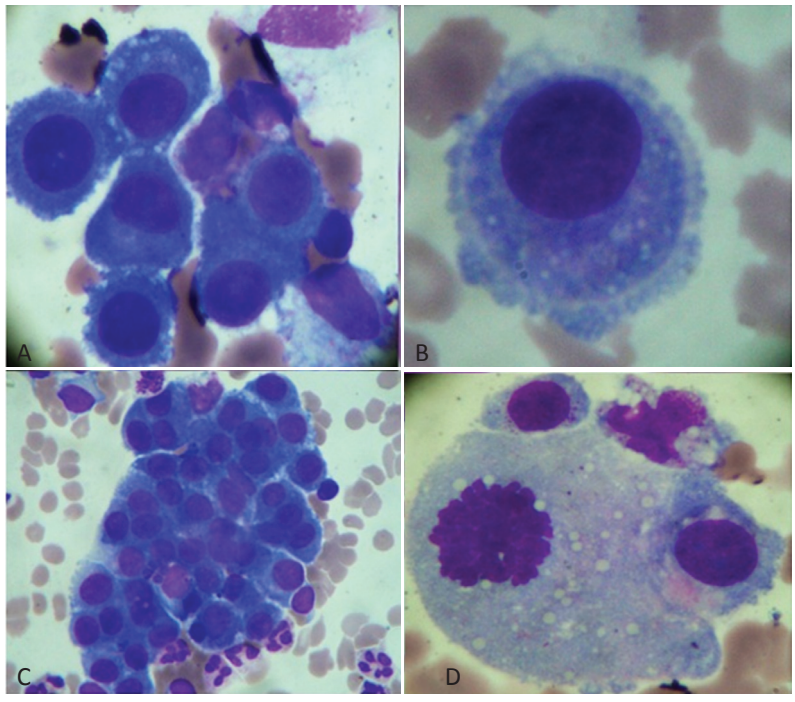


Figura 17.4 **(A** e **C)** Agrupamento de células mesoteliais. **(B)** Célula mesotelial. **(D)** Célula mesotelial em mitose.
Fonte: Autores.

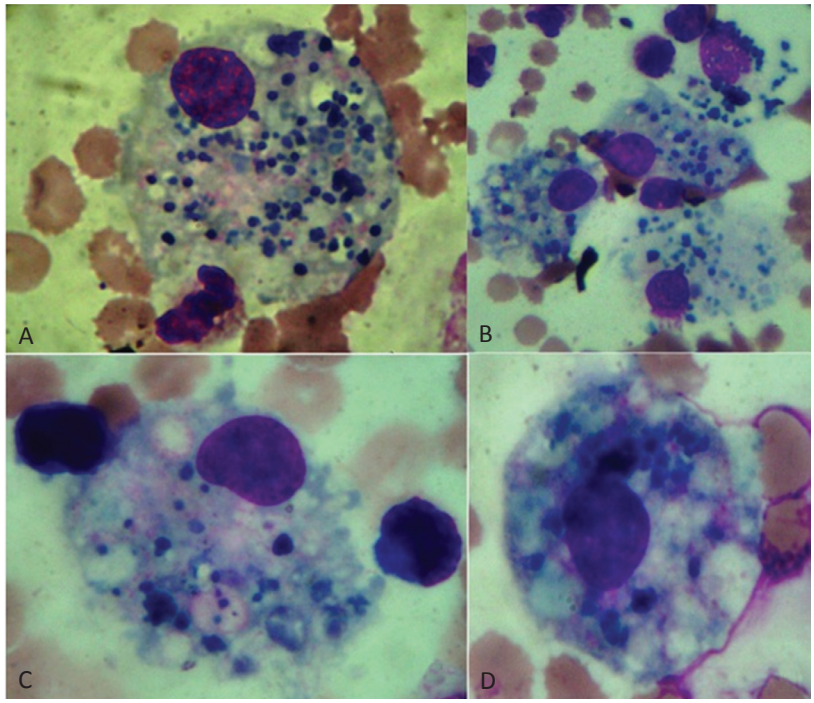


Figura 17.5 **(A, C** e **D)** Macrófagos com hemossiderina (sideróf agos). **(B)** Agrupamento de macrófagos com hemossiderina. Líquido pleural, coloração de May Grünwald & Giemsa.
Fonte: Autores.

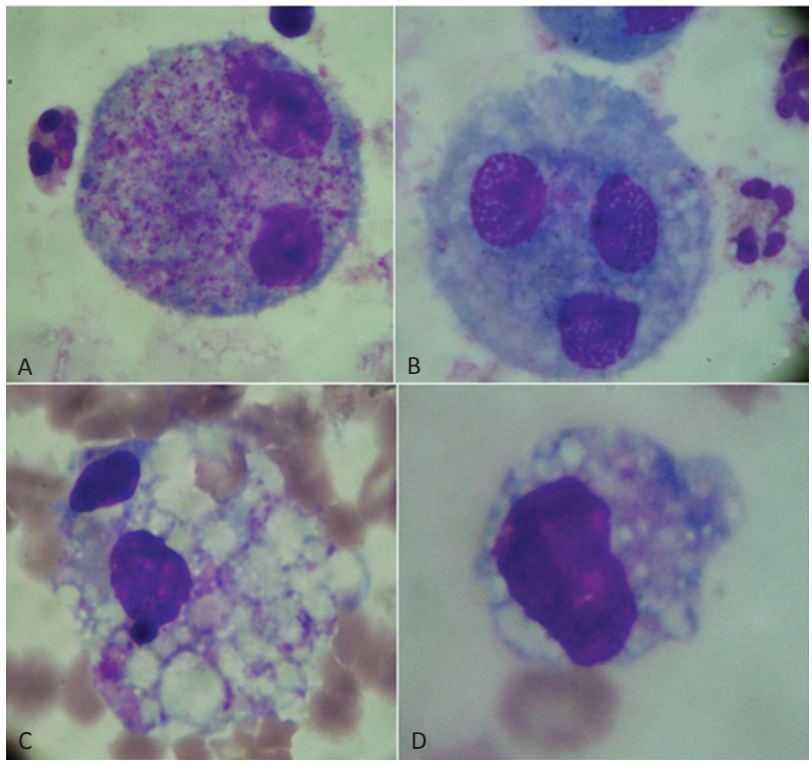


Figura 17.6 **(A)** Macrófago binucleado e com grânulos citoplasmáticos. **(B)** Macrófagos trinucleados. **(C)** Eritrófago (macrófago que fagocitou eritrócitos). **(D)** Macrófago normal. Líquido pleural, coloração de May Grünwald & Giemsa.
Fonte: Autores.

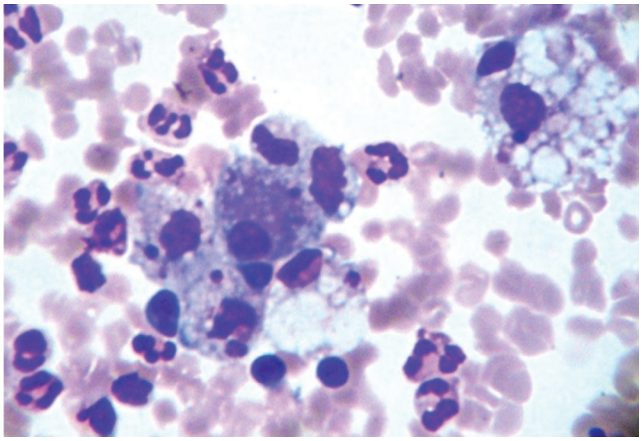


Figura 17.7 Macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eritrócitos. Líquido peritoneal, coloração de May Grünwald & Giemsa.
Fonte: Autores.

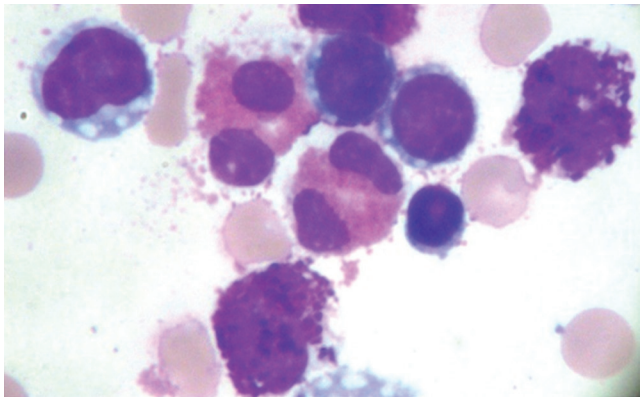


Figura 17.8 Basófilos, eosinófilos, linfócitos e eritrócitos. Líquido pleural, coloração de May Grünwald & Giemsa.
Fonte: Autores.

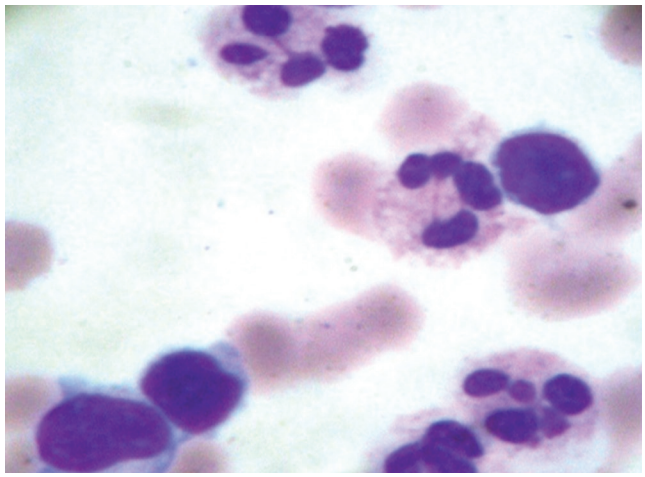


Figura 17.9 Neutrófilos, linfócitos e eritrócitos. Líquido pleural, coloração de May Grünwald & Giemsa.
Fonte: Autores.

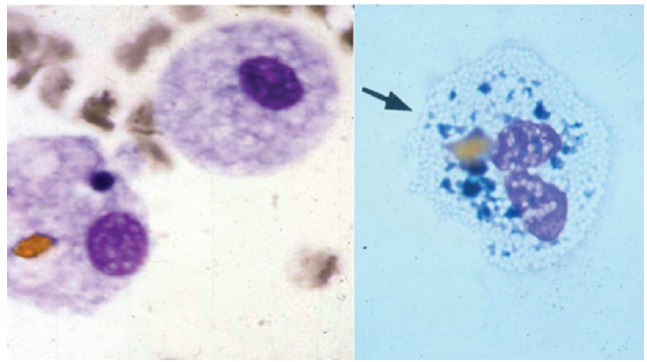


Figura 17.10 Macrófagos contendo cristal de hematoidina (hematoidinófago). Líquido pleural, coloração de May Grünwald & Giemsa.
Fonte: Webmedia, 2012.

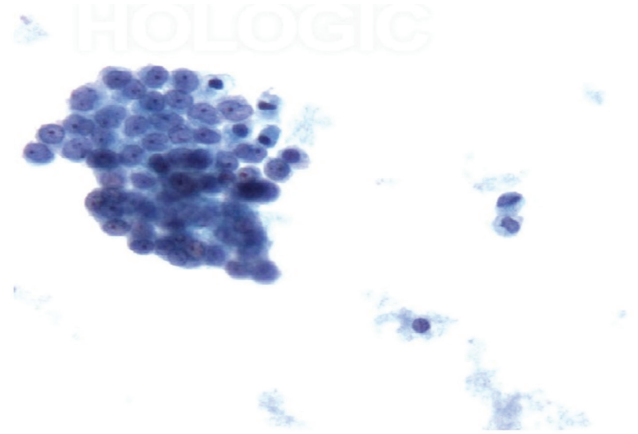


Figura 17.11 Derrame pericárdico: células mesoteliais benignas, aumento 20×. Coloração de Papanicolaou.
Fonte: Cytologystuff, 2012.

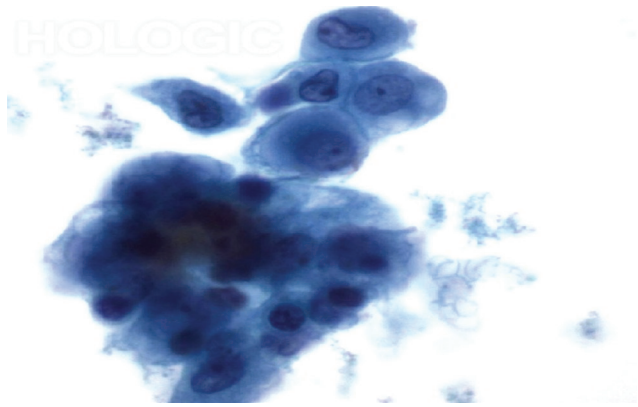


Figura 17.12 Líquido peritoneal: células mesoteliais reativas. Aumento 60×. Coloração Papanicolaou.
Fonte: Cytologystuff, 2012.

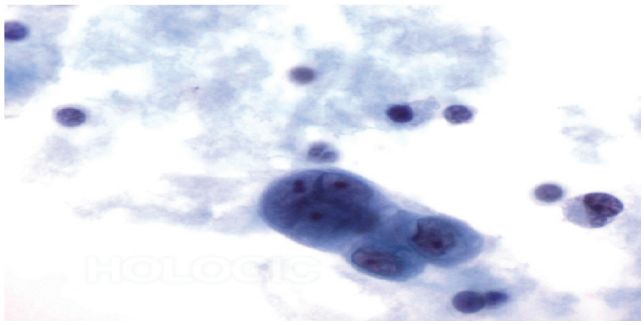


Figura 17.13 Líquido pleural: células mesoteliais reativas. Aumento 60×. Coloração Papanicolaou.
Fonte: Cytologystuff, 2012.

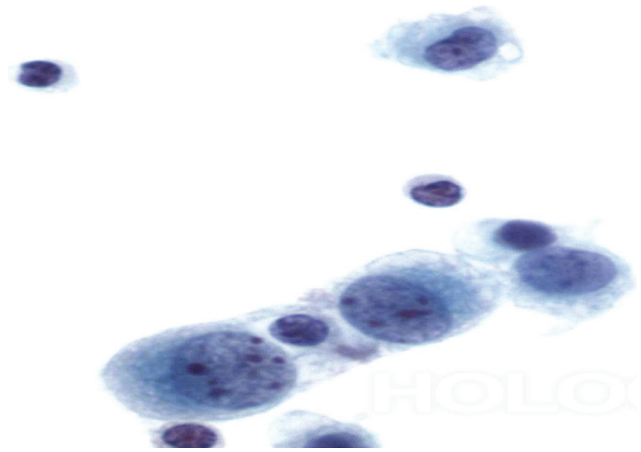


Figura 17.14 Células mesoteliais reativas em líquido pleural. Aumento 60×. Coloração Papanicolaou.
Fonte: Cytologystuff, 2012.

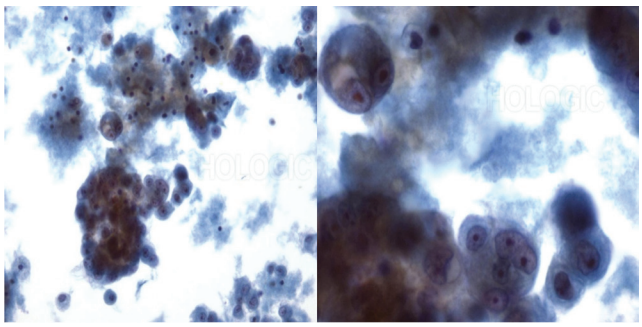


Figura 17.15 Líquido Pleural: Mesotelioma. As células tumorais podem ser vistas em efusões com sangue e com detritos proteicos. Grupos com mais de 12 células podem ser característicos de malignidade, além de nucléolos múltiplos e irregularidade nuclear. (Figuras a seguir.) Coloração Papanicolaou.
Fonte: Cytologystuff, 2012.

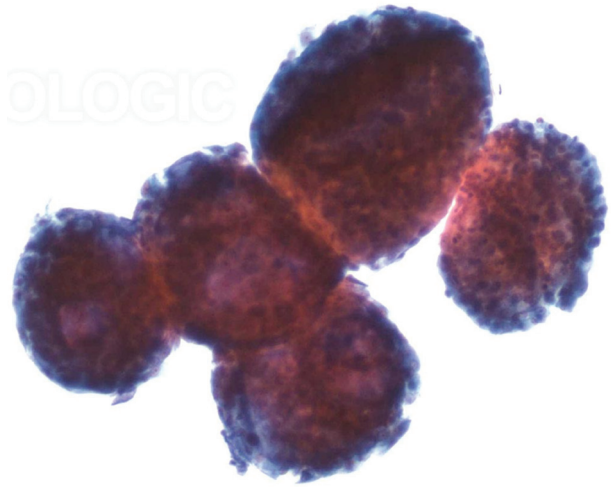


Figura 17.16 Líquido pleural: mesotelioma. Massas de células tumorais em formato de bola de canhão "*Cannon Ball*". O diagnóstico final pode exigir imunocitoquímica ou bloco celular para imuno-histoquímica, microscopia eletrônica ou outras técnicas especializadas. Coloração Papanicolaou.
Fonte: Cytologystuff, 2012.

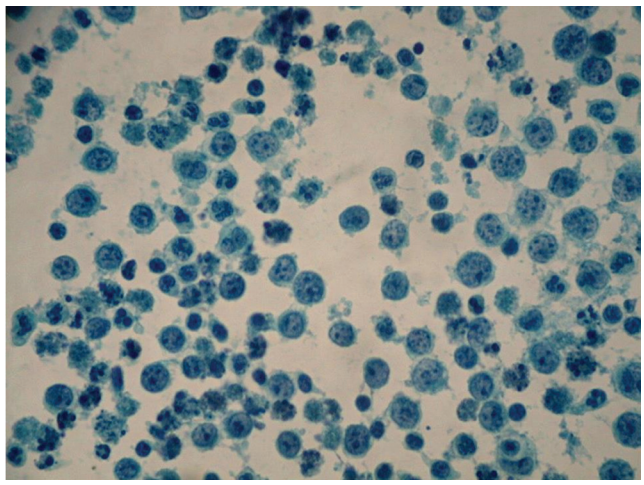


Figura 17.17 Líquido ascítico. Características morfológicas de um linfoma não Hodgkin e processo inflamatório agudo. Coloração Papanicolaou.
Fonte: Sociedade Latino-Americana de Citopatologia, Departamento de Patologia, Hospital Fundação Santojanni, 2012.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Agostoni E, Zocchi L. Pleural liquid and its exchanges. Respir Physiol Neurobiol. 2007;159(3):311-23.
2. Albright JR RE. Manegement of Cerebrospinal Fluid and Other Body Fluids. In: Koepke JA. Practical Laboratory Hematology. New York: Churchill Livingstone, 1991. p.295-310.

3. Andrade Jr, Ramos D de, et al. Ascite: estado da arte baseado em evidências. Rev Assoc Med Bras. 2009;55(4).
4. Antonangelo L, Capelozzi ZL. Coleta e preservação do líquido pleural e biópsia pleural. J Bras Pneumol. 2006;32(Supl 4):S163--S169.
5. Aulesa C, Mainar I, Prieto M, et al. Use of the Advia 120 hematology analyzer in the differential cytologic analysis of biological fluids (Cerebrospinal, Peritoneal, Pleural, Pericardial, Synovial, and Others). Lab Hematol. 2003;9(4):214-24.
6. Barreto SSM, Dalcin PTR, Jeffmann M, et al. Envolvimento pleuropulmonar no lúpus eritematoso sistêmico: revisão de aspectos clínicos e diagnóstico. J Pneumol. 1997;23(1):24-32.
7. Bennet JC, Plum F. Cecil- Tratado de Medicina Interna. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
8. Bibbo M, Longatto AF. Aspectos clínicos e laboratoriais dos derrames cavitários. Conduta terapêutica e avaliações diagnósticas e prognósticas. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
9. Blomberg DJ, Galagan K, Glassy EF. Body Fluid Analysis. In: Marchant-Kottke K, Davis BH. Laboratory Hematology Practice. Singapura: Blackwell Publishing Ltd, 2012. p.615-37.
10. Broaddus VC. Fluid and solute exchange in normal physiological states. In: Light RW, Lee YGC. Textbook of Pleural Diseases. 2.ed. London: Hodder Arnold Publications, 2008. p.43-8.
11. Burgess LJ. Review of "Biochemical analysis of pleural, peritoneal and pericardial effusions". Clin Chim Acta. 2004;61:84.
12. Butch AW, Wises PK, Wah DT, et al. A multicenter evaluation of the Iris IQ200 automated urine microscopy analyzer body fluids module and comparison with hemacytometer cell counts. Am J Clin Pathol. 2008;129(3):445-50.
13. Churchill DN, Thorpe KE, Nolph KD, et al. Increased Peritoneal Membrane Transport Is Associated with Decreased Patient and Technique Survival for Continuous Peritoneal Dialysis Patients. J Am Nephrol. 1998;9:1285-92.
14. Cirino LMI, Gomes FMS, Batista BN. The etiology of extensive pleural effusions with troublesome clinical course among children. Sao Paulo Med J. 2004;122(6):269-72.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Body Fluid Analysis for Cellular Composition; Proposed Guideline. CLSI document H56-P (ISBN 1-56238-575-5). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, USA, 2005.
16. Colt HG, Brewer N, Barbur E. Evaluation of patient-related and procedure-related factors contributing to pneumothorax following thoracentesis. Chest. 1999;116(1):134-8.
17. Comar SR, Machado NA, Schulz T, et al. Análise citológica do líquido pleural no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR. Estud Biol. 2009 jan/dez;31(73/74/75):93-102.
18. Crawford MH. Current Diagnosis & Treatment in Cardiology. 2.ed. New York: McGraw-Hill, 2007.
19. Daur AV, Botão GD, Dalla Costa LM, et al. Sensibilidade da coloração de Gram no diagnóstico prévio das infecções em sítios corporais estéreis. Visão Acadêmica. 2004;5(2):91-4.
20. Davidson B. Malignant effusions: from diagnosis to biology. Diagn Cytopathol. 2004;31(4):246-54.
21. Davis SJ, Phillips L, Griffiths AM, et al. What really happens to people on long-term peritoneal dialysis? Kidney Int. 1998;54:2207-17.
22. Fonseca LFA. Estudo do líquido pleural: Uma revisão. Rev Bras Anal Clin. 2011;43(3):245-50.
23. Froudarakis ME. Diagnostic work-up of pleural effusions. Respiration. 2008;75(1):4-13.
24. Genofre E, Chibante AMS, Macedo AG. Derrame pleural de origem indeterminada. J Bras Pneumol. 2006;32(Supl 4):S204-210.
25. Heffner JE, Brown LK, Barbieri CA. Diagnostic value of tests that discriminate between exudative and transudative pleural effusions. Chest. 1997;111:970-80
26. Heidelbaugh JJ, Sherbondy M. Cirrhosis and chronic liver failure: Part II. Complications and treatment. Am Fam Phys. 2006;74(5):767-76.
27. Holanda MA, Silva COS, Rocha RT, et al. Criptococose pleural em paciente com síndrome de imunodeficiência adquirida. J Pneumol. 1995;21(4):201-4.
28. Hutchison JG. Differential diagnosis of ascites. Semin Liver Dis. 1997;17:191- 202.
29. Jantz MA, Antony VB. Pathophysiology of pleura. Respiration. 2008;75(2):121-33.
30. Ji HL, Nie HG. Electrolyte and Fluid Transport in Mesothelial Cells. J Epithel Biol Pharmacol. 2008;1:1-7.
31. Karsher DS, Mcpherson RA. Cerebrospinal, Synovial, Serous Body Fluids, and Alternative Specimens. In: McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2011. p.480-508.
32. Kashani A, Landaverde C, Medici V, et al. Fluid retention in cirrhosis: pathophysiology and management. Q J Med. 2008;101:71-85.
33. Kjeldsberg C, Knight J. Body Fluids: Laboratory examination of cerebrospinal, seminal, serous & sinovial fluids. 3.ed. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1993.
34. Koffel KK, Reed JS. The technique of abdominal paracentesis. J Crit Illn. 1986;1:45-50.
35. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, et al. Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
36. Krige JEJ, Beckingham IJ. Portal hypertension-2. Ascites, encephalopathy, and other conditions. BMJ. 2001;322:416-8.
37. Krikorian JG, Hancock EW. Pericardiocentesis. Am J Med. 1978;65(5):808-14.
38. Kuiper JJ, Van Buuren HR, De Man RA. Ascites in cirrhosis: a review of management and complications. Neth J Med. 2007;65(8):283-8.
39. Kuiper JJ, Van Buuren HR, De Man RA. Ascites in cirrhosis: a review of management and complications. Neth J Med. 2007;65(8):283-8.
40. Lai-Fook SJ. Pleural mechanics and fluid exchange. Physiol Rev. 2004;84(2):385-410.
41. Leibovitch I, Mor Y, Colomb J, et al. The diagnosis and management of postoperative chylous ascites. J Urol. 2002;167:449-57.
42. Light RW. Clinical practice. Pleural effusion. N Engl J Med. 2002;346(25):1971-7.
43. Light RW. Pleural diseases. 4.ed. Philaldephia: Lippincott Williams Wilkins, 2001.
44. Lima AO, Soares JB, Greco JB, et al. Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica: Técnica e Interpretação. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
45. Lopes AC. Tratado de Clínica Médica. 2.ed. São Paulo: Roca Editora, 2008.

46. Mason RJ, Broaddus VC, Murray JF, et al. Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine. 4.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.
47. Mcgibbon A, Chen GI, Peltekian KM, et al. An Evidence-Based Manual for Abdominal Paracentesis. Dig Dis Sci. 2007;52:3307-15.
48. Medford A, Maskell N. Pleural effusion. Postgrad Med J. 2005;81(961):702-10.
49. Meisel S, Shamiss A, Thaler M, et al. Pleural fluid to serum bilirrubin concentration ratio for separation of transudates from exudates. Chest. 1990;98:141-4.
50. Mocelin HT, Fisher GB. Epidemiology, presentation and treatment of pleural effusion. Pediatr Respir Rev. 2002;3(4): 292-97.
51. Mohanty SK, Dey P. Serous effusions: diagnosis of malignancy beyond cytomorphology. An analytic review. Postgrad Med J. 2003;79(936):569-74.
52. Moore KP, Aithal GP. Guidelines on the management of ascites in cirrhosis. Gut. 2006;55 Suppl 6:vi1-12.
53. Munir Ebaid, et al. Cardiologia em pediatria. Temas fundamentais. São Paulo: Editora Roca, 2000.
54. Mutsaers SE. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. Respirology. 2002;7(3):171-91
55. Neves DD, Dias RM, Cunha AJLA, et al. Rendimento de variáveis clínicas, radiológicas e laboratoriais para o diagnóstico da tuberculose pleural. J Bras Pneumol. 2004;30(4):409.
56. Paris A, Nhan T, Cornet E, et al. Performance evaluation of the body fluid modeon the platform Sysmex XE-5000 series automated hematology analyzer. Int J Lab Hematol. 2010;32(5):539:47.
57. Plustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, et al. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. São Paulo: Sarvier, 2000.
58. Porcel JM, Light RW. Diagnostic approach to pleural effusions in adults. Am Fam Physician. 2006;73(7):1211-20.
59. Rocha G. Pleural effusions in neonate. Curr Opin Pulm Med. 2007;13(4):305-11.
60. Rodak BF, Fritsma GA, Keohane EM. Hematology: Clinical Principles and Applications. 4.ed. China: Elsevier Saunders, 2012.
61. Roth BJ, O'Meara TF, Cragun WH. The serum-effusion albumin gradient in the evaluation of pleural effusions. Chest. 1990;98(3):546-9.
62. Runyons BA, Montano AA, Akriviadis EA, et al. The serum--ascites albumin gradient is superior to the exudate-transudate concept in the differential diagnosis of ascites. Ann Intern Med. 1992;117(3):215-20.
63. Sahn SA. The value of pleural liquid analysis. Am J Med Sci. 2008;335(1):7-15.
64. Sales R, Onishi R. Toracocentese e biópsia pleural. J Bras Pneumol. 2006;32(Supl 4):S170-S173.
65. Seiscento M, Conde MB, Dalcomo MM. Tuberculous pleural effusions. J Bras Pneumol. 2006;32(Supl 4):S174-S181.
66. Silva CT JR, Pessoa CLC, Cardoso GP, et al. Prospective study – Meisel differentiation of pleural transudates from exudates. Eur Resp J. 2003;191.
67. Silva GA. Derrames pleurais: fisiopatologia e diagnóstico. Medicina [Ribeirão Preto]. 1998;31:208-15.
68. Soares JLM, et al. Métodos diagnósticos. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005.
69. Strasinger SK, DI Lorenzo MS. Urinálise e Fluidos Corporais. 5.ed. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2009.
70. Strimel WJ, Noe S. Journal eMedicine. 2002. Derrame pericárdico, p. 3. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://emedicine.medscape.com/article/157325-overview
71. Tarantino AB. Doenças Pulmonares. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.
72. Teixeira LR, Seiscento M, Vargas FS. Toracocentese diagnóstica e biópsia pleural. In: Vargas F, Teixeira L, Marchi E. Derrame Pleural. São Paulo: Roca, 2003. p.93-108.
73. Wal WJB, Jeekel J. Biology of the peritoneum in normal homeostasis and after surgical trauma. Colorectal Disease. 2007;2:9-13.
74. Wong CL, Leduc JH, Thorpe KE, et al. Does this patient have bacterial peritonitis or portal hipertension? How do I perform a paracentesis and analyze the results? Am Med Assoc. 2009;299:1166-78.
75. Xavier RM, Albuquerque GC, Barros E. Laboratório na Prática Clínica – Consulta Rápida. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005.

18

capítulo

Célia Regina Garlipp ▪ Paula Virginia Bottini

Urinálise

INTRODUÇÃO

O exame de urina, também denominado urinálise, é um dos exames mais antigos da medicina laboratorial, havendo relatos de sua análise há pelo menos 6 mil anos. É composto por três etapas distintas, a saber: exame físico, exame químico e análise dos elementos figurados, incluindo a pesquisa do dismorfismo eritrocitário. Habitualmente é realizado com o objetivo de estabelecer, confirmar ou complementar o diagnóstico clínico nas doenças renais, doenças urológicas e doenças metabólicas ou sistêmicas, que cursam com acometimento renal ou que levam ao aparecimento de elementos ou metabólitos anormais, sendo também útil no acompanhamento e controle do tratamento de várias afeções do trato urinário.

Trata-se de um exame de alta demanda, realizado na maioria dos laboratórios, basicamente manual, frequentemente negligenciado e sem padronização universal.

FASE PRÉ-ANALÍTICA

Coleta

Para o exame de urina de rotina (Urina I, EAS, exame sumário de urina etc.) deve-se coletar uma amostra isolada de urina, de preferência jato médio, após assepsia, tendo o paciente mantido de duas a quatro horas de estase vesical. Essa amostra pode ser randômica (coletada a qualquer momento do dia), primeira urina da manhã ou segunda urina da manhã (que apresenta boa preservação celular e correlação com as diversas proteínas em amostras de 24 horas). A coleta de urina via cateter ou sonda é um procedimento de profissional da área de enfermagem e é realizada apenas com solicitação médica. A coleta de urina através de punção suprapúbica é um procedimento médico. Crianças sem controle da micção necessitam fazer uso de coletores autoaderentes para obtenção da amostra.

Pacientes submetidos a procedimentos com qualquer tipo de contraste deverão coletar a amostra de urina antes de realizar o procedimento ou de 24 a 48 horas após o término do mesmo.

Conservantes

O conservante ideal é aquele capaz de prevenir o crescimento bacteriano, não interferir na análise química e preservar os elementos formados no sedimento. A metodologia mais utilizada na conservação da urina é a refrigeração. Amostras de urina destinadas a cultura podem ser armazenadas sob refrigeração por até 24 horas. Não há consenso sobre a duração da refrigeração no caso das amostras destinadas à análise de rotina da urina.

Transporte e armazenamento

As amostras de urina devem ser transportadas em caixas com tampa e de forma a prevenir derramamentos, com temperatura controlada dependendo da distância que esse material será transportado. No caso de transporte em tubo pneumático deve-se garantir a integridade da amostra junto ao fornecedor do equipamento.

Após a coleta, as amostras devem ser encaminhadas em até duas horas ao laboratório a fim de eliminar possíveis alterações celulares e bioquímicas, e processadas o mais rapidamente possível. Após esse período, mantida em temperatura ambiente, a urina começa a apresentar elevação do pH, diminuição da glicose (glicólise e consumo), corpos cetônicos (volatilização), bilirrubina (exposição à luz), urobilinogênio (oxidação a urobilina) e nitrito (redução a nitrato), aumento das bactérias e turbidez, alteração da cor (oxidação ou redução de metabólitos), degradação de hemácias e cilindros. Quando se tratar de pesquisa de componentes fotossensíveis, a amostra deverá ser protegida da luz.

Urinas mantidas sob refrigeração tendem a ter sua análise microscópica com possível precipitação de cristais.

Critérios de rejeição

Os critérios de rejeição podem variar para cada laboratório, mas devem incluir: requisição incompleta ou ilegível, material mal identificado ou com contaminação visível a olho nu (material fecal, óleo ou outros resíduos), amostras com volume insuficiente e inadequadas para realização do teste solicitado.

FASE ANALÍTICA

Os componentes do exame de urina incluem a avaliação das características macroscópicas (cor e aspecto), físicas (pH e densidade ou gravidade específica), químicas (através de tiras reagentes), microscópicas e testes confirmatórios.

Exames físico e macroscópico

Cor

A cor da urina geralmente apresenta variados tons de amarelo, dependendo diretamente da quantidade de água ingerida e também de exercícios físicos. O principal pigmento responsável pela coloração da urina é o Urocromo. Outras colorações apresentadas pela urina podem estar relacionadas a alguma patologia, a alterações metabólicas, à alimentação ou à presença de metabólitos de drogas utilizadas.

Aspecto

A urina normal, recém-emitida, é límpida ou discretamente opalescente. As substâncias que frequentemente alteram o aspecto da urina são: células epiteliais em grande número, leucócitos, hemácias, bactérias e leveduras, cristais e filamentos de muco. Contaminantes como talco, cremes vaginais e contrastes radiográficos também interferem no aspecto da urina.

Depósito

A presença de depósito na urina está diretamente relacionada à quantidade de substâncias em suspensão. São os mesmos elementos que alteram o aspecto da urina e, por isso, não possuem nenhum significado clínico, não havendo necessidade de relatá-lo.

Odor

O odor característico da urina é denominado *sui generis*, e pode ser mais ou menos intenso, dependendo da quantidade de ácidos aromáticos presentes na amostra. Quando se deixa a amostra em repouso, o odor de amônia passa a ser predominante em função da degradação da ureia. Raramente possui significado clínico, e não costuma ser relatado. Sugere-se seu relato apenas no caso de doenças metabólicas genéticas, que causam odores característicos (exemplo: doença do xarope de bordo, relacionada a erros metabólicos da leucina, isoleucina e valina).

Densidade

Reflete o estado de hidratação do paciente e a capacidade dos rins de concentrar a urina. Pode ser avaliada por refratometria ou por gravidade específica (concentração iônica). Refratometria reflete a concentração de todas as partículas dissolvidas na amostra, podendo sofrer interferência da glicosúria e/ou da proteinúria. Nas tiras reagentes determina-se a gravidade específica, que se baseia na mudança aparente do pKa de certos polieletrólitos em relação à concentração iônica da amostra. Os resultados não são afetados por componentes não iônicos da urina como a glicose, embora alguns interferentes como proteinúria e cetonúria significativos possam ocasionar resultados falsamente elevados.

Exame químico

A análise química é realizada através de tiras reagentes. Baseia-se em metodologia de química seca, cujos resultados podem ser determinados visualmente ou por instrumentos semiautomatizados ou automatizados.

A fim de se obter resultados mais reprodutíveis e confiáveis, devem-se observar alguns cuidados na manipulação e conservação das tiras reagentes, como se segue:

- Manter o frasco fechado com o dissecante, e em local fresco.
- Estocar no frasco original.
- Evitar misturar tiras de frascos ou lotes diferentes.
- Não expor as tiras a substâncias voláteis.
- Evitar tocar a área reagente.
- Não utilizar a tira que apresente alteração de cor em alguma área reagente.
- Nunca cortar as tiras reagentes.

Com relação à utilização das tiras reagentes, é necessário, antes de tudo, homogeneizar bem a amostra e, a seguir, mergulhar rapidamente a tira reagente na amostra e retirar o excesso de urina da mesma. A leitura visual é realizada comparando as cores obtidas com a escala-padrão, respeitando o tempo de cada reação.

As leitoras semiautomatizadas ou automatizadas são fotômetros de reflectância, que medem a luz refletida a partir da área reagente. Esses equipamentos medem objetivamente a intensidade dessas reações e eliminam as variações de leitura dependente do tempo de reação e intensidade de cor. A grande vantagem de sua utilização é a padronização dos tempos de leitura e a eliminação das variações subjetivas decorrentes da interpretação das cores obtidas em cada área reagente.

pH

O pH varia com o tipo de alimentação. Dietas ricas em proteínas são responsáveis por urinas ácidas, enquanto na dieta vegetariana a urina é mais alcalina. O pH urinário tem importante papel na detecção de possíveis distúrbios eletrolíticos, tanto de origem metabólica como respiratória, além de indicar, também, defeitos de reabsorção tubular ou de secreção tubular de ácidos ou bases.

Não são conhecidas substâncias que interferem com a medida do pH urinário. Quando a urina é colocada em excesso na tira pode haver contaminação dessa área reagente pelo tampão ácido do teste da proteína, fornecendo um resultado de pH mais ácido.

Sangue (hemoglobina)

O teste baseia-se na atividade da pseudoperoxidase da porção heme da hemoglobina. O teste é ligeiramente mais sensível à hemoglobina e à mioglobina do que aos eritrócitos intactos.

Uma das maiores dificuldades na sua interpretação é a presença de inúmeras reações falso-positivas, associadas à alta sensibilidade da área reagente. Reações falso-positivas ocorrem na

presença de mioglobina, de outras peroxidases, como a peroxidase bacteriana, de contaminação com hipoclorito e formol ou mesmo em uma eventual contaminação com sangue menstrual.

Dentre as causas de resultados falso-negativos destacam-se densidade aumentada, presença de proteína, nitrito e ácido ascórbico elevados, e metabólitos de captopril. Vale lembrar que em urinas alcalinas a sensibilidade do teste é reduzida.

Proteína

Esse teste é mais sensível à presença de albumina, não detectando a proteína de Tamm-Horsfall, que é a principal matriz dos cilindros.

A pesquisa de proteínas através das tiras reagentes baseia-se no princípio do "erro proteico" de um indicador de pH. Presença de resíduos de desinfetantes com amônio quaternário ou cloro-hexidina no recipiente de coleta da urina pode levar a resultados falso-positivos. Reações falso-negativas são observadas com a excreção de outras proteínas que não a albumina, como é o caso do mieloma múltiplo (excreção de cadeias leves livres).

A presença de proteínas na urina é um dos principais indicadores de doença renal, e sua dosagem em amostras isoladas de urina só tem significado clínico se corrigida com a creatinina urinária e deve ser realizada mediante solicitação médica.

Glicose

A glicose na urina aparece quando a quantidade de glicose que entra na luz dos túbulos excede sua capacidade de reabsorção. Essa situação ocorre na vigência de hiperglicemia, quando a glicemia supera níveis de 160 a 180 mg/dL. Observa-se glicosúria sem hiperglicemia em lesões ou disfunções tubulares ou, ainda, em situações em que existe diminuição do limiar de reabsorção da glicose nos túbulos como é o caso de gestantes, crianças e idosos.

A pesquisa de glicose através das tiras reagentes é realizada pela glicose-oxidase, sendo, portanto, específica para glicose, não detectando outros açúcares como frutose, lactose ou galactose. Resultados falso-negativos são observados na presença de níveis elevados de cetonas e de ácido ascórbico, especialmente nas amostras com baixas concentrações de glicose.

Não existe significado clínico para a dosagem de glicose em amostras isoladas de urina.

Cetonas

Normalmente não observamos a presença de cetonas na urina. A detecção de cetona ou ácido acetoacético pelas tiras reagentes baseia-se na reação do nitroprussiato de sódio com o ácido acetoacético. Outros corpos cetônicos como acetona e ácido β-hidroxibutírico não são detectados. Resultados positivos estão associados com cetoacidose diabética, jejum prolongado, algumas dietas para emagrecimento, febre e exercícios intensos. Surgem em decorrência do metabolismo de ácidos graxos.

Resultados falso-positivos podem ser observados na presença de altas concentrações de metabólitos da levodopa, substâncias contendo grupos sulfidrila ou em amostras de urina muito pigmentadas.

Bilirrubina

Apenas a bilirrubina direta (conjugada) é encontrada em amostras de urina. Sua presença está relacionada às icterícias obstrutivas e às hepatocelulares (hepatites, cirrose hepática) A detecção de bilirrubina baseia-se em uma reação de acoplamento em meio ácido com sal diazônio estabilizado e formação de cromógeno rosado a vermelho.

É uma das reações mais sujeitas à ação de interferentes, dando origem a cores atípicas na área reagente. Resultados falso-positivos devem-se à presença de substâncias que causam alterações na cor normal da urina tal como metabólitos de drogas que contêm tinturas de azo, nitrofurantoína e riboflavina. Outras causas de resultados falso-positivos incluem urobilinogênio elevado, fenotiazina e clorpromazina. Por outro lado, a exposição prolongada da amostra à luz ultravioleta (luz solar), presença de nitrito ou de grandes quantidades de ácido ascórbico podem causar resultados falso-negativos.

Urobilinogênio

Urobilinogênio em concentrações aumentadas na urina está relacionado ao excesso de produção de bilirrubina, como é o caso das hemólises, ou como consequência da redução da sua reabsorção, como nas lesões hepáticas. É detectado por meio de uma reação de acoplamento do urobilinogênio com sal de diazônio, com formação de pigmento de cor rosa e, da mesma forma que ocorre na pesquisa de bilirrubina, a exposição prolongada da amostra à luz ultravioleta (luz solar), presença de nitrito, formalina, ou de grandes quantidades de ácido ascórbico podem causar resultados falso-negativos. Dentre as principais causas de resultados falso-positivos destacam-se urinas muito pigmentadas e a presença de metabólitos de nitrofurantoína, riboflavina, fenazopiridina, ácido p-aminobenzoico e drogas que contêm tinturas de azo.

A relação entre bilirrubina e urobilinogênio está resumida no Quadro 18.1.

Quadro 18.1 Resumo da relação entre bilirrubina e urobilinogênio.

	Birirrubina	Urobilinogênio
Obstrução biliar	+++ (bilirrubina direta)	Negativo
Lesão hepática	+/–	+
Hemólise	Negativa (bilirrubina indireta)	+++

Fonte: Cortesia de Célia Regina Garlipp e Paula Virginia Bottini.

Nitrito

O teste do nitrito baseia-se na capacidade que algumas bactérias têm em reduzir o nitrato, presente na urina, a nitrito. Surge em decorrência da presença de bactérias na urina, que reduzem o nitrato a nitrito (bactérias gram-negativas fermentadoras, como *Escherichia coli, Klebsiella spp, Proteus spp,* e algumas cepas de *Pseudomonas)*. Resultados falso-negativos com consequência da presença de bactérias que não reduzem o nitrato, da falta de nitrato na dieta (nos lactentes e em dietas com baixa ingestão de vegetais verdes, por exemplo) e de incubação da urina na bexiga insuficiente para que ocorra a redução de nitrato a nitrito.

Leucócito (Leucócito-esterase)

Essa reação consiste na pesquisa da esterase leucocitária, presente nos granulócitos intactos ou lisados. Pode estar associado a infecção urinária ou a processos inflamatórios das vias urinárias. Vale lembrar que na presença de leucócitos não granulócitos essa reação é negativa. Cor intensa da urina também pode interferir na reação.

Resultados falso-negativos podem ser observados com o uso de alguns antibióticos, como cefalexina e cefalotina e tetraciclina. Altas concentrações de ácido oxálico também inibem a reação. Reações falso-positivas podem ser observadas na presença de metabólitos de antibióticos à base de imipenem, meropenem ou ácido clavulânico. Outras causas de resultados falso-negativos incluem a presença de agentes oxidantes (hipoclorito de sódio) e de formaldeído.

Testes confirmatórios

Por definição, teste confirmatório é aquele que detecta uma mesma substância com sensibilidade e/ou especificidade igual ou superior ao teste realizado ou, ainda, é um teste que utiliza uma reação ou metodologia diferente para detectar a mesma substância.

Algumas substâncias podem reagir com determinados reagentes das tiras e produzir uma reflectância semelhante àquela produzida por baixas concentrações do analito e levar a resultados falso-positivos. Assim, reações positivas para bilirrubina e urobilinogênio devem sempre ser confirmadas, pois, apesar de algumas tiras reagentes e equipamentos para sua leitura possuírem área para compensação de cor, essas duas áreas são as mais sujeitas a fornecer resultados falso-positivos. As técnicas mais utilizadas são as reações de Fouchet (bilirrubina) e de Erlich (urobilinogênio).

As demais áreas da tira reagente possuem menos interferentes e não necessitam de testes confirmatórios.

Análise microscópica

A análise microscópica sempre tem início com a observação da amostra em menor aumento para avaliar a disposição dos elementos, a composição geral do sedimento e a presença ou não de cilindros. A identificação e contagem de todos os elementos presentes são realizadas em aumento de 400×. Quando o sedimento é analisado em microscopia de campo claro, muitos elementos têm a mesma refringência que a urina, sendo visíveis apenas com baixa iluminação (como é o caso dos cilindros hialinos).

Atualmente encontram-se disponíveis no mercado sistemas que controlam o volume do sedimento examinado através de lâminas com câmaras capazes de conter um volume predeterminado e constante. Embora seja recomendável dar preferência ao uso desses sistemas de contagem padronizados, as contagens em câmara de Fuchs-Rosenthal e entre lâmina e lamínula continuam válidas.

Interpretação da análise microscópica

Leucócitos

Leucocitúria é a presença de número aumentado de leucócitos na urina, sendo na maioria das vezes leucócitos polimorfonucleares neutrófilos. Indica inflamação no trato urogenital, cuja causa mais frequente é a infeção do trato urinário. Algumas situações fisiológicas podem levar à leucocitúria, como é o caso de desidratação, febre e exercícios físicos extenuantes. Nefrite tubulointersticial (presença de eosinófilos na urina), uso de alguns medicamentos (glicocorticoides, ciclofosfamida, indinavir), rejeição de transplante renal (linfócitos), glomerulonefrites e doenças inflamatórias sistêmicas podem estar associadas à leucocitúria variável (Figura 18.1).

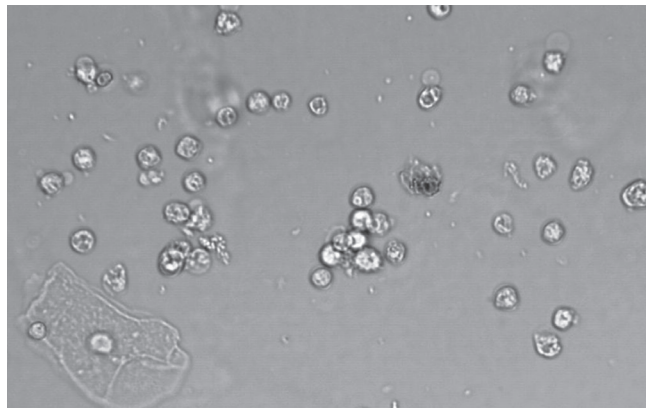


Figura 18.1 Leucócitos.
Fonte: Cortesia de Célia Regina Garlipp e Paula Virginia Bottini.

Hemácias

Hematúria é a emissão de urina contendo hemácias em número variável, podendo ser macroscópica ou microscópica (Figura 18.2). A presença de hematúria é uma das alterações mais frequente nos exames de urina. Inúmeras são as causas de hematúria, e sua presença deve ser sempre investigada, mesmo nos casos assintomáticos. A diferenciação entre hematúria de origem glomerular daquela de origem não glomerular é realizada através da pesquisa da morfologia das hemácias (dismorfismo eritrocitário).

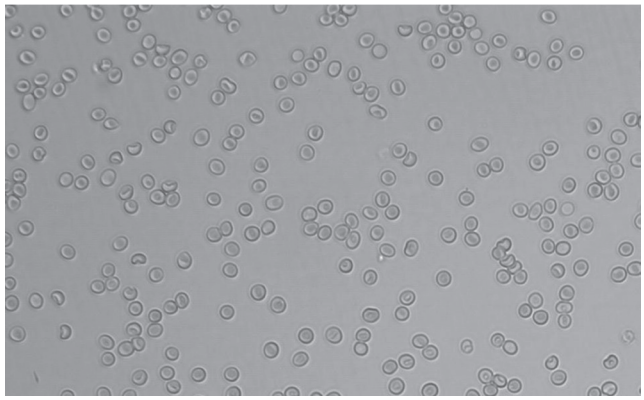


Figura 18.2 Hemácias.
Fonte: Cortesia de Célia Regina Garlipp e Paula Virginia Bottini.

Dismorfismo eritrocitário

No início dos anos de 1980, Birch e Fairley, estudando urina de pacientes com glomerulonefrites observaram que as hemácias presentes nessas amostras apresentavam alterações morfológicas específicas quando examinadas sob microscopia de contraste de fase (a perda do conteúdo de hemoglobina, ruptura da membrana celular, extrusões citoplasmáticas e depósito de material fase-denso na região da membrana celular).

Uma década se passou até que, em 1991, Köhler e colaboradores descreveram diversas formas de hemácias encontradas na urina e sugeriram que a presença de acantócitos era um marcador bastante específico de hematúria glomerular. Posteriormente, vários autores demonstraram que, além dos acantócitos, os codócitos também eram marcadores de hematúria glomerular, e esse conjunto de células recebeu a denominação de células G1. Vale destacar que, apesar de mais específico para hematúria glomerular, a presença de acantócitos isoladamente é pouco frequente, sendo mais comum a observação de codócitos, seja de forma isolada ou em associação com acantócitos (Figura 18.3).

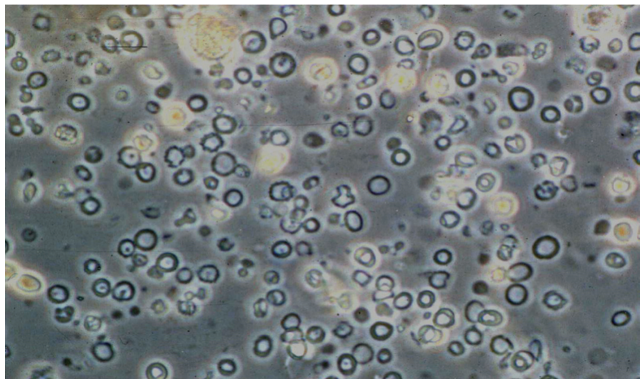


Figura 18.3 Dismorfismo eritrocitário - numerosos codócitos e raros acantócitos.
Fonte: Cortesia de Célia Regina Garlipp e Paula Virginia Bottini.

É importante ressaltar que o padrão-ouro para a pesquisa de dismorfismo eritrocitário é a microscopia de contraste de fase.

Cilindros

Formam-se principalmente no interior do túbulo contorcido distal e ducto coletor, e têm matriz primariamente composta por glicoproteína de Tamm-Horsfall (ocasionalmente albumina), sendo sua aparência influenciada pelos elementos presentes no filtrado durante a sua formação. É importante lembrar que a glicoproteína de Tamm-Horsfall não é detectada através das tiras reagentes. A formação do cilindro depende inicialmente da redução ou parada do fluxo urinário no néfron, associada à precipitação de proteínas presentes na luz dos túbulos, englobando elementos celulares eventualmente presentes. Os cilindros assim formados aparecerão na urina quando houver a retomada do fluxo urinário através do néfron. Didaticamente, os cilindros podem ser classificados em acelulares (que incluem os cilindros hialinos, hialino-granulosos, granulosos, céreos, lipoídicos, hemoglobínicos e bilirrubínicos), e em celulares (cilindros hemáticos, leucocitários e epiteliais) (Figura 18.4).

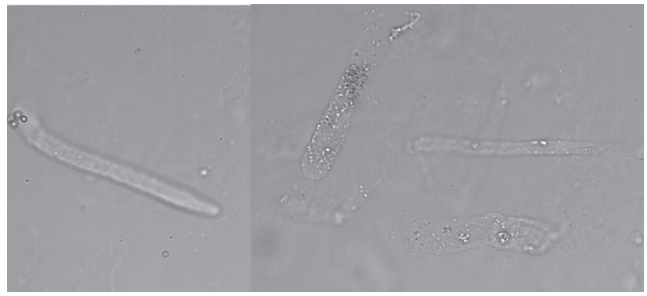


Figura 18.4 Cilindro hialino (esquerda) e hialino-granulosos (direita).
Fonte: Cortesia de Célia Regina Garlipp e Paula Virginia Bottini.

O cilindro hemático apresenta alta especificidade para hematúria glomerular, embora seja de difícil visualização e de baixa prevalência (Figura 18.5).

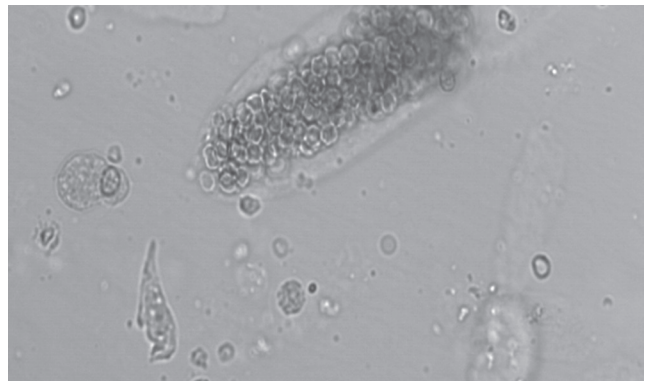


Figura 18.5 Cilindro hemático.
Fonte: Cortesia de Célia Regina Garlipp e Paula Virginia Bottini.

Cristais

São frequentemente observados na análise do sedimento urinário. Cristais surgem da precipitação de determinados sais presentes na urina, na dependência do pH, temperatura e concentração. A maioria dos cristais não tem significado patológico, como é o caso dos cristais de oxalato de cálcio, ácido úrico, fosfatos, carbonatos, urato de amônia e precipitados amorfos. Outros cristais, como os de leucina, colesterol, cistina e fosfato triplo amoníaco-magnesiano (também chamado de estruvita) estão relacionados a condições patológicas (Figura 18.6).

Células epiteliais

O achado de células epiteliais raramente possui significado clínico conclusivo. As células mais frequentemente observadas são: células pavimentosas (frequentes tanto em homens quanto em mulheres, provenientes de células da vagina e das porções inferiores da uretra, Figura 18.7), células de epitélio de transição (originárias da bexiga e porção superior da uretra), e células do túbulo renal (sua presença sugere lesão tubular).

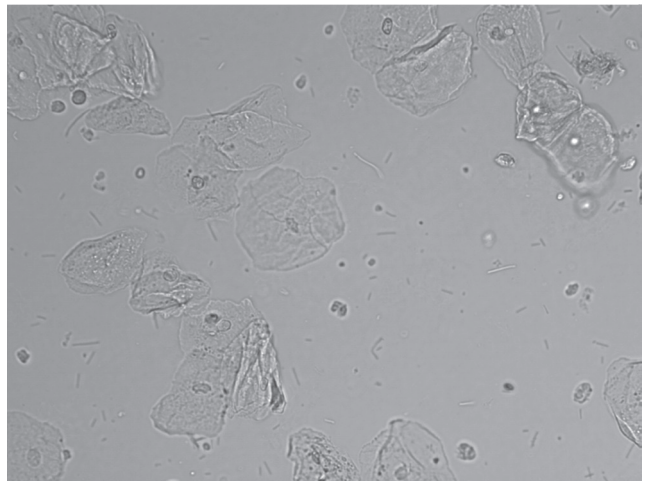


Figura 18.7 Células epiteliais pavimentosas.
Fonte: Cortesia de Célia Regina Garlipp e Paula Virginia Bottini.

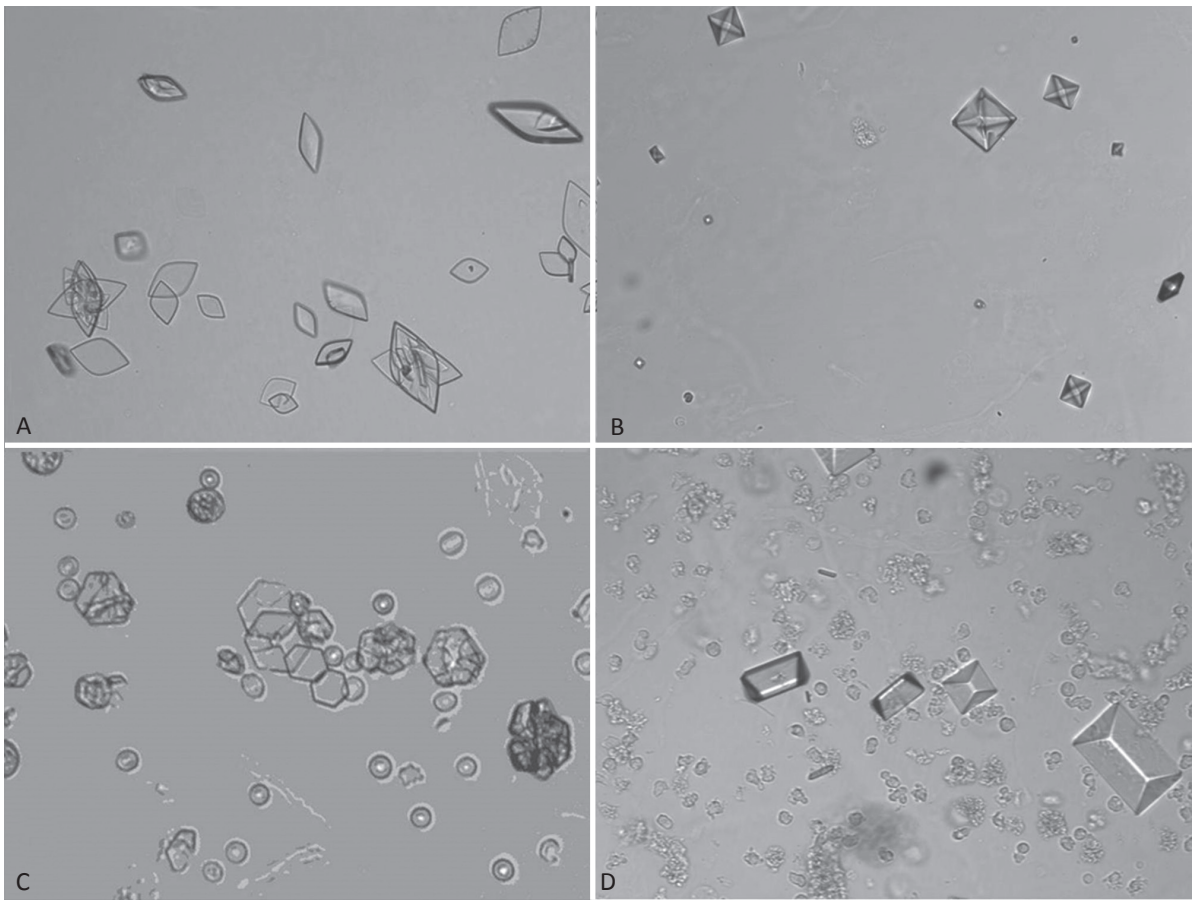


Figura 18.6 Cristais de ácido úrico **(A)**, oxalato de cálcio **(B)**, cistina **(C)** e fosfato triplo amoníaco-magnesiano **(D)**.
Fonte: Cortesia de Célia Regina Garlipp e Paula Virginia Bottini.

Outros elementos

Outros elementos presentes na urina são as bactérias, filamentos de muco, eventualmente parasitas e espermatozoides, que podem ou não ser relatados na dependência da padronização de cada laboratório, além de possíveis artefatos como cristais de talco e fibras (Figura 18.8).

FASE PÓS-ANALÍTICA

Fase pós-analítica é responsável por cerca de 20% dos erros em um laboratório clínico. Corresponde à interpretação dos achados laboratoriais, digitação, conferência, emissão e entrega dos laudos.

Uma etapa crítica é a interpretação dos achados laboratoriais, correlacionando-se o exame físico-químico e os elementos formados. Desconsiderar um achado da análise, desconhecer o papel dos interferentes e não analisar todos os achados em conjunto estão situados entre os principais erros nessa fase.

Por ser um exame em que frequentemente os resultados ainda não são interfacetados e, sim, digitados manualmente, o laboratório deve ter um procedimento de revisão para detectar e corrigir erros de transcrição que possam afetar a conduta clínica. O sistema de informática pode dispor de alertas, na etapa de digitação, para resultados improváveis ou absurdos. O interfaceamento de equipamentos de urinálise automatizados com o sistema de informática elimina possíveis erros de transcrição.

Vale lembrar que o ciclo de um exame laboratorial termina quando o médico requisitante recebe seu laudo final.

AUTOMAÇÃO EM URINÁLISE

Microscopia manual é um procedimento demorado e com grande variabilidade interobservadores. Técnicas automatizadas eliminam o preparo prévio do material com consequente melhoria do fluxo de trabalho e aumento de produtividade. Atualmente existem três opções de automa-

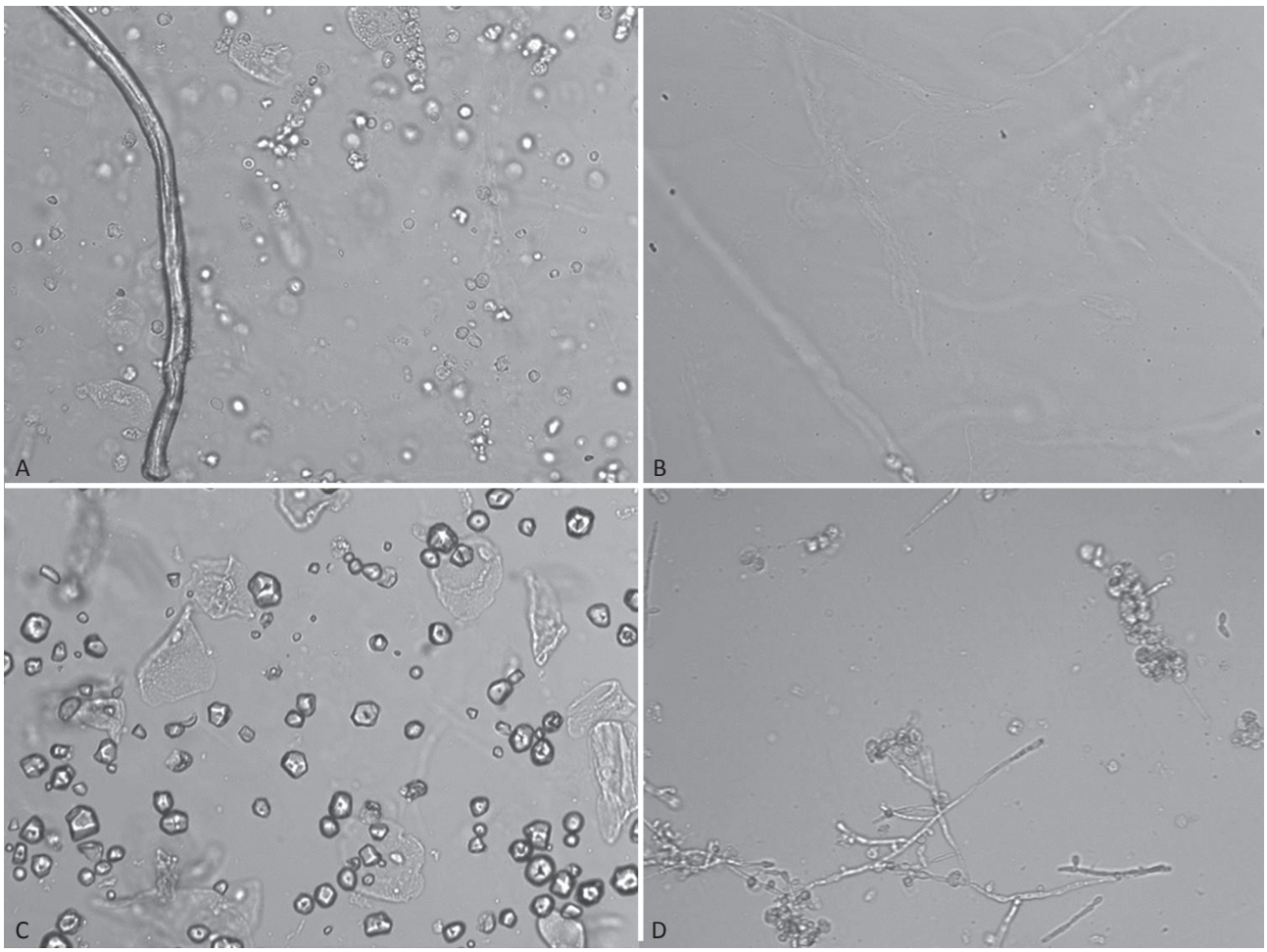


Figura 18.8 Outros elementos – fibra **(A)**, filamentos de muco **(B)**, cristais de talco **(C)** e leveduras em hifas e gemulação **(D)**.
Fonte: Cortesia de Célia Regina Garlipp e Paula Virginia Bottini.

ção para análise dos elementos figurados presentes na urina. Esses equipamentos são baseados em citometria de fluxo, em análise de imagens digitalizadas com autorreconhecimento de partículas, ou em microscopia automatizada com imagem digitalizada. Esses equipamentos podem ser integrados com as leitoras automatizadas de tiras reagentes.

Semelhante aos analisadores hematológicos, o citômetro fluxo urinário baseia-se em características estruturais e/ou imunológicas das células e demais partículas para identificação dos elementos presentes na urina. Utiliza amostras de urina não centrifugadas, sendo que células, bactérias e cilindros são analisados e classificados levando-se em consideração o volume (impedância), o tamanho (dispersão de luz) e as características tintoriais (fluorescência) nucleares e citoplasmáticas. A distinção entre hemácias e leveduras é feita de acordo com a intensidade de suas fluorescências. Existe necessidade de confirmação através de microscopia óptica, na dependência do tipo de alteração detectada ou alerta sinalizado pelo equipamento.

A análise de imagens digital com autorreconhecimento de partículas classifica e quantifica os elementos presentes em uma amostra de urina não centrifugada, baseando-se no tamanho e forma destes. As imagens são coletadas e podem ser reclassificadas pelo operador, com o potencial de reduzir a necessidade de revisão microscópica das amostras patológicas.

Já a microscopia automatizada com imagem digitalizada corresponde à automação de microscopia manual tradicional. O equipamento realiza a homogeneização, a centrifugação em uma cuveta especial e análise do sedimento urinário em um microscópio acoplado a uma câmara digital. Os elementos presentes no sedimento são classificados em um módulo de autoavaliação de imagens. As imagens capturadas podem ser reavaliadas pelo analista, minimizando a necessidade de revisão microscópica das amostras alteradas.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Andriolo A. Função renal e exame de urina. São Paulo: Sarvier, 2012 (Coleção 156 perguntas e respostas).
2. Barta Z, Kránicz T, Bayer G. UriSed Technology - A standardized automatic method of urine sediment analysis. Eur Infect Dis. 2011;5(2):139-42.
3. Birch DF, Fairley KF, Whitworkth JA, et al. Urinary erythrocyte morphology in the diagnosis of glomerular hematuria. Clin Nephrol. 1983;20:78-84.
4. Block DR, Lieske JC. Automated urinalysis in the clinical lab. Med Lab Obs. 2012;44(10):8-10, 12, quiz 14.
5. Bottini PV, Alves MAVFR. Investigação laboratorial das hematúrias. In: Kirsztajn GM. Diagnóstico Laboratorial em Nefrologia. São Paulo: Sarvier, 2010. Cap. 24, p.198-200.
6. Bottini PV, Garlipp CR, Franco-Fernandes LF. Urinalysis: comparison between microscopic analysis and a new automated microscopy image-based urine sediment instrument. Clin Chem. 2010;56(S6):A12.
7. Bottini PV, Garlipp CR. Urinálise: comparação entre microscopia óptica e citometria de fluxo. J Bras Patol Med Lab. 2006;42(3):157-62.
8. Brunzel NA. Chemical Examination of Urine. In: Urine and Body Fluid Analysis. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 2004.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute Urinalysis. Approved Guideline. 3.ed. 2009, CLSI GP16-A3.
10. Colombeli ASS, Falkenberg M. Comparação de bulas de duas marcas de tiras reagentes utilizadas no exame químico de urina. J Bras Patol Med Lab. 2006;42(2):85-93.
11. Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 20.ed. Philadelphia: Saunders, 2001.
12. Köhler H, Wandel E, Brunck B. Acanthocyturia - A characteristic marker for glomerular bleeding. Kidney Int. 1991;40:115-20
13. Mayo S, Quiñones-Torrelo AD, Canós C, et al. Clinical laboratory automated urinalysis: comparison among automated microscopy, flow cytometry, two test strips analyzers, and manual microscopic examination of the urine sediments. J Clin Lab Anal. 2008;22(4):262-70.
14. Nagahama D, Yoshiko K, Watanabe M, et al. A useful new classification of dysmorphic urinary erythrocytes. Clin Exp Nephrol. 2005;9:304-9.
15. Nguyen GK. Urine Cytology in Renal Glomerular Disease and Value of G1 Cell in the Diagnosis of Glomerular Bleeding. Diagn Cytopathol. 2003;29(2):67-73
16. Oliveira AN, Barnabé A, Denardi CL, et al. Caracterização do Dismorfismo Eritrocitário em pacientes com Hematúria atendidos em um Hospital Terciário. Anais do 41o Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, 2007.
17. Sato AF, et al. Nitrito urinário e infecção do trato urinário por cocos gram-positivos. J Bras Patol. 2005;41(6):397-404.
18. Simerville JA, Maxted WC, Pahira JJ. Urinalysis: A Comprehensive Review. Am Fam Physician. 2005;71:1153-62
19. Strasinger AS, Di Lorenzo MS. Urinálise e Fluidos Corporais. 5.ed. São Paulo: LMP, 2009.
20. Surita RJS, Bottini PV, Alves MAVFR. Erytrhocytes morphology in diagnosing the origin of hematuria. Kidney Int. 1994;46(6):1749.
21. Zaman Z, Fogazzi GB, Garigali G, et al. Urine sediment analysis: analytical and diagnostic performance of sediMAX - a new automated microscopy image-based urine sediment analyser. Clin Chim Acta. 2010;411(3-4):147-54.

PARTE

5

Toxicologia

Mauren Isfer Anghebem

19

capítulo

Sérgio Eduardo Fontoura da Silva

Controle Toxicológico

INTRODUÇÃO

Na produção de grande número de produtos, desde eletroeletrônicos a xampus, os trabalhadores estão expostos a pelo menos uma substância química potencialmente prejudicial ao organismo humano. Portanto, é importante que seja feito um monitoramento dessa exposição a fim de se evitar que ocorra o desenvolvimento de uma intoxicação a ponto de comprometer a saúde do indivíduo.

O monitoramento dessa exposição é feito de duas formas: uma ambiental, onde se coletam amostras do ar do ambiente de trabalho, e outra biológica, onde é feita a coleta de uma amostra biológica do trabalhador exposto (normalmente sangue ou urina), e nesta se pesquisa e se quantifica um biomarcador relacionado com a substância a que o indivíduo está exposto, tal biomarcador é denominado Indicador Biológico de Exposição (IBE).

O controle biológico da exposição ocupacional, exame de laboratório executado por laboratórios de análises clínicas, teve no Brasil, nos últimos anos, um aumento considerável em sua demanda, e isso ocorreu basicamente por dois motivos: 1) aumento na fiscalização por parte do Ministério do Trabalho e do Emprego; e 2) o interesse do empresariado em adentrar no mercado internacional, cada vez mais competitivo, onde se requer provas de que esse tipo de exame é rotineiramente executado em seus funcionários. Há uma terceira razão, econômica: os trabalhadores que são mais bem avaliados correm menos riscos de adoecer e, portanto, faltam menos ao trabalho e tendem a produzir mais.

Neste capítulo serão apresentados alguns grupos de substâncias a que os trabalhadores estão expostos, os indicadores biológicos de exposição normalmente empregados, quando for o caso, e foram citadas as técnicas mais empregadas. Ao final do capítulo é encontrada uma tabela (Tabela 19.1), que

Tabela 19.1 Controle ambiental e biológico da exposição ocupacional a algumas substâncias químicas de acordo com a legislação brasileira em vigor*.

Substância	Limite de tolerância		Controle biológico de exposição					
	ppm	mg/m³	Amostra	IBE[a]	VR[b]	IBMP[c]	Método[d]	Obs.[#]
Anilina	4	15	Urina Sangue	p-aminofenol metemoglobina	- Até 2%	50 mg/g[e] 5%	CG E	FJ FJ-O1
Arsênio	0,04**	0,16**	Urina	Arsênio	Até 10 µg/g[e]	50 µg/g[e]	EAA	IFS + T6
Cádmio	-	-	Urina	Cádmio	Até 2 µg/g[e]	5 g/g[e]	EAA	NC + T6
Carbamatos e ésteres organofosforados	-	-	Sangue	AChE BChE BChE e AChE	Determinar a atividade de pré-exposição	Até 30%[f] Até 50%[f] Até 25%[f]	EE	NC
Chumbo	-	0,1	Sangue Urina	Chumbo Zincoprotoporfirina ALA[g]	Até 40 µg/dL Até 40 µg/dL Até 4,5 mg/g[e]	60 µg/dl 100 µg/dl 10 mg/g[e]	EAA HF E	NC + T1

(*Continua*)

Tabela 19.1 Controle ambiental e biológico da exposição ocupacional a algumas substâncias químicas de acordo com a legislação brasileira em vigor*. (*Continuação*)

Substância	Limite de tolerância		Controle biológico de exposição					
	ppm	mg/m³	Amostra	IBE[a]	VR[b]	IBMP[c]	Método[d]	Obs.[#]
Cromo	-	-	Urina	Cromo	Até $\mu g/g^e$	30 $\mu g/g^e$	EAA	FS
Diclorometano	156	560	Sangue	Carboxiemoglobina	Até 1% NF[g]	3,5 % NF[g]	E	FJ + O1
Dimetilformamida	8	24	Urina	N-metilformamida	-	40 mg/g[e]	CG ou CLAE	FJ
Dissulfeto de carbono	16	47	Urina	Ácido 2-tio-triazolidina-4-carboxílico	-	5 mg/g[e]	CG ou CLAE	FJ
Estireno	78	328	Urina Urina	Ácido mandélico Ácido fenilglioxílico	- -	1,5 g/g[e] 240 mg/g[e]	CG ou CLAE	FJ
Etilbenzeno	78	340	Urina	Ácido mandélico	-	1,5 g/g[e]	CG ou CLAE	FS
Fenol	4	15	Urina	Fenol	20 mg/g[e]	250 mg/g[e]	CG ou CLAE	FJ + O1
Flúor e fluoretos	-	-	Urina	Fluoreto	Até 0,5 mg/g[e]	***	IS	PP4
Mercúrio	-	0,04	Urina	Mercúrio	5 $\mu g/g^e$	35 $\mu g/g^e$	EAA	PU + T12
Metanol	156	200	Urina	Metanol	Até 5 mg/L	15 mg/L	CG	FJ + O1
Metil-etil-cetona	155	460	Urina	Metil-etil-cetona	-	2 mg/L	CG	FJ
Monóxido de carbono	39	43	Sangue	Carboxiemoglobina	Até 1% NF[g]	3,5 % NF[g]	E	FJ + O1
n-hexano	-	-	Urina	2,5-hexanodiona	-	5 mg/g[e]	CG	FJ
Nitrobenzeno	-	-	Sangue	Metemoglobina	Até 2%	5%	E	FJ + O1
Pentaclorofenol	-	-	Urina	Pentaclorofenol	-	2 mg/g[e]	CG ou CLAE	IFS
Tetracloroetileno	-	-	Urina	Ácido tricloro acético	-	3,5 mg/L	E	IFS
Tolueno	78	290	Urina	Ácido hipúrico	Até 1,5 g/g[e]	2,5 g/g[e]	CG ou CLAE	FJ + O1
Tricloroetano	275	1480	Urina	Triclorocompostos totais[h]	-	40 mg/g[e]	E	FS
Tricloroetileno	78	420	Urina	Triclorocompostos totais[h]	-	300 mg/g[e]	E	FS
Xileno	78	340	Urina	Ácido metil hipúrico	-	1,5 g/g[e]	CG ou CLAE	FJ

*Normas Regulamentadoras números 7 e 15; ** Forma de Arsina; [a] Indicador Biológico de Exposição; [b] Valor de Referência da Normalidade; [c] Índice Biológico Máximo Permitido; [d] Metodologia indicada: CG = cromatografia gasosa; CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência; E = espectrofotometria ultravioleta/visível; EAA = espectrometria de absorção atômica; EE = método espectrofotométrico enzimático; HF = hematofluorimetria; IS = eletrodo íon seletivo[e] por grama de creatinina, unidade empregada para corrigir distorções devido à função renal do trabalhador que está sendo avaliado; [f] em relação a atividade de pré-exposição; [g] Não Fumantes; *** 3 mg/g no início da jornada de trabalho e 10 mg/g no final da jornada de trabalho; [h] Ácido tricloroacético e tricloroetanol; [#] Momento da coleta da amostra: FJ = final da jornada de trabalho (evitar o final da primeira jornada da semana); FS = final da jornada do último dia da semana; IFS = início da última jornada da semana; PP4 = colher a pré e a pós-exposição na 4ª jornada de trabalho da semana; PU = primeira urina da manhã; NC = momento de amostragem não crítico; T1 = iniciar a monitorização a partir de um mês de exposição; T6 = iniciar a monitorização a partir de seis meses de exposição; T12 = iniciar a monitorização a partir de 12 meses de exposição; O1 = pode-se fazer a diferença entre pré e pós-jornada de trabalho.

resume a forma de monitoramento prevista pela legislação brasileira em vigor.

COMPOSTOS METEMOGLOBINIZANTES

A metemoglobina (metHb) é um indicador biológico de exposição a uma variedade de agentes químicos capazes de oxidar o ferro ferroso do grupamento prostético da hemoglobina (Hb): o radical HEME. Esta Hb anormal, devido à presença do íon férrico, não é capaz de transportar oxigênio. A metHb é continuamente produzida nos eritrócitos normais, mas ela é imediatamente reduzida pela enzima metHb-redutase na presença de NADPH, de modo que sua concentração nos eritrócitos não passe de 1%, sob condições anormais, como a deficiência da G-6PD (glicose-6 fosfato--desidrogenase), estresse oxidativo, administração de certos fármacos, e exposição a algumas substâncias químicas, a metHb é produzida muito mais rapidamente e o organismo não consegue reduzi-la na mesma velocidade. A Tabela 19.2 apresenta a relação de algumas substâncias químicas capazes de converter a hemoglobina em metHb, que podem estar presentes no local de trabalho, e, portanto, os trabalhadores devam ser monitorados quanto a esse parâmetro.

Tabela 19.2 Substâncias químicas associadas com metemoglobinemia.

Fármacos	Agentes químicos
Benzocaína; Lidocaína; Prilocaína	Anilina, dimetilanilina, m-metilanilina, nitroanilinas, tolueno diamina
Dapsona; Sulfonamida	Nitrobenzeno Dinitrobenzenos Nitroclorobenzenos 2-Nitropropano Tetranitrometano Dinitrotolueno Nitrotolueno Trinitrotolueno
Nitrato de amila; Nitrito de isobutila; Nitrato de Prata	Xilidinas
Nitroglicerina; Óxido Nítrico	Nitritos e Nitratos
Primaquina	Toluidinas
Fenacetina	Óxido nítrico
Metoclopramida	Anisidina

Fonte: Adaptada de Klaassen e Watkins, 2003; Oga *et al.*, 2008.

Os agentes metemoglobinizantes, quanto ao mecanismo de geração da metHb são divididos em três grupos:

a) **Oxidantes diretos:** os que oxidam diretamente o ferro da hemoglobina, como os cloratos, cromatos hexavalentes e sais de cobre.

b) **Oxidantes indiretos:** os que levam a oxidação do ferro da hemoglobina após produzirem radicais livres que efetivamente foram a metHb, como os nitratos e nitritos.

c) **Oxidantes após biotransformação:** são os compostos que se tornam metemoglobinizantes após sofrerem reação de biotransformação, como é o caso dos amino e nitroderivados do benzeno.

Há outras causas não químicas de metemoglobinemia ou condições genéticas, apesar de serem raras, que podem aumentar a metemoglobinemia em trabalhadores ocupacionalmente expostos, sem, contudo, ter ocorrido uma exposição tão grande, como por exemplo a deficiência de metemoglobina NADH-redutase nos eritrócitos. Além disso, a presença de agentes metemoglobinizantes, como nitratos em água para consumo humano ou em alguns alimentos, como embutidos, com ou sem a presença de nitritos, apesar de que a metemoglobinemia nesses casos seja mais importante em crianças, sugere-se que no dia da coleta do exame o trabalhador se abstenha de ingerir alimentos que contenham nitratos e/ou nitritos como conservantes, por exemplo, embutidos e carnes vermelhas.

Para a determinação da metHb pode-se usar como anticoagulante a heparina ou EDTA. As amostras de sangue deverão ser coletadas ao final do último dia da jornada semanal de trabalho. As amostras devem ser hemolisadas, e se a análise não for realizada imediatamente as amostras devem ser estocadas em tampão fosfato pH 7,0, sob refrigeração, por até uma semana.

BENZENO

O benzeno é um líquido incolor, volátil, ponto de ebulição 80,1 °C, inflamável, lipossolúvel, e o seu uso como solvente é proibido no Brasil desde 1995, havendo exposição ocupacional nas indústrias química (síntese de diversos derivados do benzeno), petroquímica, de combustíveis e siderúrgica onde há queima de carvão mineral. Sem mencionar a exposição não ocupacional através da poluição do ar nas grandes cidades.

A monitorização biológica da exposição ocupacional ao benzeno pode ser feita usando-se como IBE o próprio benzeno (no ar expirado ou sangue); seus produtos de biotransformação analisados na urina: ácido trans, transmucônico (AttM) e ácido fenilmercaptúrico ou, ainda, um IBE de efeito: a N^7 fenilguanina na urina. No Brasil se emprega o AttM urinário (AttM-U) como IBE.

O ácido sórbico, conservante de alimentos (queijos, carnes, peixe desidratado, vegetais em conserva, bebidas etc.), é também biotransformado em AttM, portanto, é interessante conhecer os hábitos alimentares do trabalhador exposto que estiver sendo avaliado quanto à exposição ao benzeno. Além disso, a ingestão de álcool parece diminuir a excreção do benzeno na forma de AttM, e o hábito de fumar está positivamente correlacionado com a concentração urinária do AttM.

A portaria 34, de 20 de dezembro de 2001, define os pormenores de amostragem e técnica para o monitoramento da exposição ocupacional ao benzeno:

As amostras de urina devem ser colhidas em coletores universais de plástico, de 50 mL, ao término da jornada de trabalho, para jornadas de 6 a 8 horas diárias, coletar a urina a partir do 3º dia de exposição. Os frascos devem ser imediatamente fechados e, quando necessário, podem ser estocados sob refrigeração (~4 °C) por até uma semana, porém o ideal é que tão logo a coleta seja feita o material seja imediatamente enviado ao laboratório. Se, por algum motivo, a análise não puder ser feita no prazo citado, a amostra poderá ser congelada (- 20 °C) por um tempo não superior a trinta dias.

A portaria 34 recomenda que a análise seja feita usando-se o método preconizado por Ducos *et al.*, podendo ser usadas modificações como a sugerida por de Paula *et al.*, onde o AttM é extraído usando-se colunas de troca iônica e posteriormente identificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando-se uma coluna de fase reversa. A temperatura da coluna é mantida em 40 °C e a fase móvel constitui-se de ácido acético a 1% - metanol (90:10) e detecção em UV a 264 nm.

Deve-se medir ao mesmo tempo a concentração urinária de creatinina, e o resultado deverá ser expresso em mg do AttM por grama creatinina (mg/g creatinina).

Em pessoas não ocupacionalmente expostas, a concentração média de AttM-U é de 0,5 mg/g de creatinina, e não existe um IBMP para o benzeno. Deve-se correlacionar a concentração de AttM-U com a concentração de benzeno no ar do ambiente de trabalho, como se pode verificar na Tabela 19.3. No Brasil a concentração de benzeno no ar do ambiente de trabalho pode variar de 1 a 2,5 ppm de benzeno, dependendo do ramo de atividade da empresa.

Tabela 19.3 Correlação entre a concentração do benzeno no ar do ambiente de trabalho e a concentração do AttM-U*.

Benzeno no ar		AttM-U	
ppm	mg/m³	mg/L	mg/g creatinina**
1,0	3,3	2,0	1,7
2,0	6,5	3,0	2,5
4,0	13,0	5,0	4,2
6,0	19,5	7,0	5,8

*Adaptada da Portaria 34; **considerando uma concentração média de creatinina de 1,2 g por litro de urina.

Fonte: Portaria 34, de 20 de dezembro de 2001, Ministério do Trabalho e do Emprego.

O ácido sórbico e o sorbato são usados como conservantes alimentares e biotransformados em AttM, como mencionado previamente, e estão presentes em bolos e massas em geral, de modo que antes da coleta de urina é interessante orientar os trabalhadores a não consumir esses tipos de alimento no dia em que a coleta for realizada.

TOLUENO

O tolueno é um hidrocarboneto aromático, incolor, volátil e desde que o benzeno não é mais empregado como solvente, seu uso industrial no Brasil tornou-se muito mais amplo. É encontrado naturalmente no petróleo, está presente na gasolina e em outros combustíveis, usado em síntese química e como mencionado, como solvente, está presente na composição de tintas, colas, polidores, desengordurantes e removedores.

O controle da exposição ocupacional é feito no Brasil medindo na urina do trabalhador exposto o principal produto da biotransformação do tolueno que é o ácido hipúrico, entretanto outros indicadores têm sido propostos, como o orto- cresol e o próprio tolueno urinário.

O ácido hipúrico (AH) é medido na urina através de cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), métodos recomendados pela Norma Regulamentadora número 7 do Ministério do Trabalho. O AH é encontrado na urina tanto de pessoas expostas ao tolueno, como de não expostas, ao passo que o ortocresol, também produzido durante a biotransformação do tolueno, é encontrado em concentração significativa apenas naqueles que estiverem se expondo ao tolueno, portanto, esse indicador biológico seria mais sensível que o ácido hipúrico.

O benzoato de sódio usado como conservante é biotransformado no organismo em ácido hipúrico, assim é interessante orientar os trabalhadores a não consumirem, no dia da coleta de urina, alimentos que possam contê-lo, como é o caso de sucos de frutas, margarina, conservas de frutas e vegetais, xaropes e bebidas carbonatadas, e chimarrão.

MONÓXIDO DE CARBONO

O monóxido de carbono (CO) é um gás incolor, inodoro, insípido, não irritante, produzido pela combustão incompleta do carbono. A principal origem é a combustão de combustíveis fósseis (gasolina, diesel, querosene e carvão mineral). Também é encontrado em depósitos de grãos, como canola, onde, dependendo de algumas condições, pode chegar a concentrações em torno de 400 ppm. A título de comparação, a concentração máxima permitida no ambiente de trabalho é de 39 ppm.

O CO pode ser gerado durante a biotransformação hepática de algumas substâncias, como é o caso do cloreto de metileno e do diclorometano, portanto a exposição ocupacional a esses solventes pode ser causa de exposição também ao CO. Esses solventes se depositam no tecido adiposo e a toxicidade do monóxido de carbono pode se manifestar dias após a exposição aos solventes. O CO é produzido durante a degradação fisiológica do grupamento HEME (hemoglobina, citocromo-oxidase, mioglobina, peroxidase e catalase).

A concentração de CO no ar gira em torno de 10 ppm (11 mg/m³), podendo ser maior em áreas urbanas. No Brasil o limite de tolerância ao gás, no ambiente de trabalho, é de 39 ppm (43 mg/m³).

A principal e mais conhecida ação tóxica do CO é a sua capacidade em se ligar à hemoglobina, formando a carboxi-hemoglobina (HbCO), que não é capaz de transportar oxigênio aos tecidos quando a quantidade de HbCO for muito grande, e poderá haver hipóxia tecidual com consequente sofrimento celular, necrose, e possível morte do indivíduo. A exposição crônica está relacionada com anemia ou eritrocitose, cefaleia, alterações de comportamento e aceleração do processo de aterosclerose pelo ataque e consequente resposta inflamatória no endotélio dos vasos sanguíneos. Por outro lado, baixas concentrações de CO promovem vasodilatação e melhora o fluxo sanguíneo em vasos comprometidos com a aterosclerose.

A HbCO é o indicador biológico de exposição ao CO. A amostra biológica é sangue, onde além desse indicador pode ser medido o próprio CO através de cromatografia gasosa. Nesse método o CO é reduzido a metano e este é detectado através da ionização de chama. O CO pode ser medido no ar expirado por carboximetria, equipamento com funcionamento semelhante ao etilômetro (vulgar bafômetro) ou por carboxímetro de pulso, instrumento parecido com o oxímetro, metodologia não aprovada para fins de fiscalização do Ministério do Trabalho.

A HbCO é medida por métodos espectrofotométricos, como o de Beutler e West, o qual tem o inconveniente de ser necessário preparar duas alíquotas de sangue, uma que deverá ser saturada com oxigênio (100% de HbO_2) e a outra com CO (100% de HbCO) para ser possível determinar com maior precisão a taxa de HbCO.

Os valores de referência para a HbCO na população não ocupacionalmente exposta e não fumante, pelo método mais usado, é de 0,9 a 1,1%. Em pessoas fumantes esses níveis podem ser até cinco vezes mais elevados, e a legislação prevê um IBMP de até 3,5% para trabalhadores não fumantes.

COMPOSTOS ANTICOLINESTERÁSICOS – ÉSTERES ORGANOFOSFORADOS E CARBAMATOS

Estima-se que milhões de agricultores são intoxicados atualmente no mundo, e mais de 20 mil morrem em consequência da exposição ocupacional a agrotóxicos, a maioria em países em desenvolvimento como o Brasil.

Os inseticidas organofosforados (OrgPO4) e carbamatos estão entre os agrotóxicos mais empregados atualmente na agricultura brasileira. A intoxicação aguda é devida à inibição das esterases, como a acetilcolinesterase (E.C 3.1.1.7 - AChE) e são observados os sintomas devido à hiperestimulação dos receptores nicotínicos e muscarínicos da acetilcolina. Por outro lado, a exposição crônica a esses compostos, como a que ocorre com os trabalhadores ocupacionalmente expostos, está relacionada com outros efeitos tóxicos, por exemplo: carcinogenicidade, mutagenicidade, cardiotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, infertilidade, podendo atravessar a barreira hematoplacentária e afetar o desenvolvimento embrionário ou fetal. Depressão e ansiedade são psicopatologias comuns em trabalhadores expostos a esses compostos. Em algumas regiões do Brasil a frequência maior de suicídio ou de tentativas de suicídio pode estar correlacionada ao uso de compostos desse grupo de inseticidas.

Os compostos organofosforados inibem a AChE (tanto cerebral - bAChE como a eritrocitária - rbcAChE) e a butirilcolinesterase (E.C. 3.1.1.8 - BChE), esta é mais abundante que as formas de AChE, e a BChE é inibida antes por compostos como os organofosforados e carbamatos. Essas duas enzimas são usadas como indicadores de exposição aos inseticidas organofosforados e carbamatos.

A BChE, no passado conhecida como pseudocolinesterase ou colinesterase do plasma (ou do soro), cuja função fisiológica não está bem esclarecida, talvez esteja relacionada com a desintoxicação de alguns compostos como a butirilcolina. No controle da divisão celular de algumas células, ela hidrolisa diversos ésteres, além da acetilcolina e da butirilcolina, a atividade enzimática baixa não significa apenas exposição a agrotóxicos anticolinesterásicos, pois existem outras causas de atividade diminuída. Por outro lado, a atividade pode estar aumentada por outros fatores, como pode ser observado na Tabela 19.4.

Tabela 19.4 Causas de atividade diminuída ou aumentada da butirilcolinesterase.

Causas de atividade diminuída	
Tipo	**Condição**
Genética	Variantes da BChE: alelos atípicos (A), resistente ao fluoreto
Variação fisiológica	Após a 10ª semana de gestação, recém-natos e crianças
Causas adquiridas	Hepatopatias Queimados Doenças infecciosas Câncer de próstata
Iatrogênicas	Inseticidas organofosforados e carbamatos Propranolol Terapia com estrogênios Clorpromazina Terapia com anticolinesterásicos
Dietética	Dieta rica em solanáceas (batata, berinjela, pimentão, tomate)
Causas de atividade aumentada	
Tipo	Condição
Fisiopatológica	Hipercolesterolemia, Síndrome metabólica Síndrome nefrótica Diabetes mellitus do tipo II

Fonte: Adaptata de Lockridge, 2015.

Em geral, o agricultor exposto aos compostos organofosforados e/ou carbamatos trabalha e reside a uma certa distância dos laboratórios de referência, onde as condições para medir com precisão as atividades da BChE e/ou da AChE são mais adequadas. Por esta razão, não raramente as amostras de sangue devem ser transportadas congeladas. Outra alternativa é o uso de métodos mais simples para medir a atividade da BChE, que não dependam de equipamento muito sensível para ser transportado em estradas rurais, como é o caso dos métodos baseados na metodologia proposta por Ellman em 1959, dentre eles o método descrito em 1973 por Dietz e cols., no qual um equipamento mais rústico como um fotocolorímetro pode ser empregado. Existem disponíveis no mercado *kits* que usam esse procedimento.

A espectrofotometria UV é a mais recomendada, tendo em vista sua sensibilidade e precisão, embora essa técnica dificilmente poderá ser realizada em local próximo do trabalhador.

Para verificar a atividade da rbcAChE, a amostra também é sangue e pode ser usado o sangue total e medir a atividade das duas enzimas ao mesmo tempo ou apenas os eritrócitos, e deste modo medir exclusivamente a atividade da rbcAChE. Os métodos mais usados são baseados no mesmo princípio do teste de Ellman.

Independentemente da enzima escolhida para a avaliação da exposição ocupacional a inseticidas organofosforados e/ou carbamatos, devem ser coletadas duas amostras de sangue: a primeira, antes do início do trabalho e consequente exposição; e a segunda ao final da jornada de trabalho (pós-exposição). Haverá uma redução da atividade em relação à pré-exposição, que não pode ser maior que 50% para a BChE, 30% para a rbcAChE, ou 25% se forem empregadas as duas enzimas.

A atividade das enzimas usadas como IBEs dos compostos anticolinesterásicos poderá estar mais baixa nos trabalhadores que apresentem variantes genéticos de uma outra enzima, a paraoxonase-1 (PON-1), responsável pela hidrólise de alguns compostos organofosforados no plasma sanguíneo, a qual também deve ser avaliada.

CHUMBO

Os trabalhadores estão expostos ao chumbo em várias atividades, tais como: montagem e manutenção de motores de veículos automotores, fundições, fabricação e retífica de baterias automotivas, nas indústrias bélica, metalúrgica, química, de tintas e pigmentos, extrativa e cerâmica.

Dentre os IBEs existentes para o controle da exposição ocupacional ao chumbo podem ser citados: chumbo sanguíneo (Pb-S), ácido δ-aminolevolínico urinário (ALA-U) e zincoprotoporfirina (ZPP-S).

O IBE mais usado é o Pb-S. O metal, durante sua distribuição, se encontra parte ligado aos eritrócitos e parte livre no plasma. Por esta razão, a amostra é de sangue total. O metal é medido por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.

O IBMP para o chumbo sanguíneo é de até 60 μg/dL, entretanto níveis de acima de 40 μg/dL podem provocar danos subclínicos, que já deveriam ser considerados. A legislação que trata do controle da exposição ocupacional – a NR-7 – considera que mesmo que o IBMP não seja ultrapassado, a saúde do trabalhador está sob risco, pois o chumbo, ainda de acordo com a norma, pode estar associado a um efeito ou a uma disfunção do sistema biológico avaliado.

A coleta da amostra pode ser feita em qualquer dia e horário, desde que o trabalhador esteja em trabalho contínuo nas últimas quatro semanas, sem afastamento por mais de quatro dias, e a monitorização deve começar após um mês de exposição.

Pode ocorrer exposição não ocupacional ao chumbo, a que o trabalhador também pode estar exposto, tais como: ingestão de bebidas alcoólicas (vinhos e destilados, uso de tintura de cabelo, tabagismo, que devem ser levadas em consideração quando da interpretação dos resultados.

O ácido δ-aminolevulínico (ALA) é o primeiro precursor da síntese do heme (Figura 19.1). O chumbo, durante exposição crônica, inibe algumas enzimas dessa síntese, como a ALA-desidratase (ALA-D) provocando o aumento da concentração de ALA no sangue, e consequentemente na urina, constituindo-se em um IBE de efeito para o chumbo. A ALA-D é uma enzima polimórfica, ou seja, na população são encontrados indivíduos que apresentam atividade enzimática mais elevada, e outros com atividade diminuída, mais suscetível aos efeitos nocivos do chumbo, podendo apresentar maior concentração de ALA na urina, embora isso não signifique que o indivíduo esteja sob exposição excessiva ao chumbo.

Para determinação do ALA-U existem desde métodos espectrofotométricos até cromatográficos. Os métodos espectrofotométricos medem tanto o ALA como outras aminocetonas, e por isso tendem a apresentar valores mais elevados de ALA, principalmente nas amostras com concentrações menores de 5 mg/L.

A legislação pertinente, a NR-7, recomenda que o exame seja feito por método espectrofotométrico, e a amostragem deve ser feita em qualquer dia e horário, desde que o trabalhador esteja em trabalho contínuo nas últimas quatro semanas, sem afastamento maior que quatro dias. No caso específico do ALA-U, recomenda-se que a coleta seja feita após pelo menos um mês de exposição.

O método mais empregado primeiramente condensa o ALA pelo acetoacetato de etila e o produto dessa condensação é extraído com acetato de etila. Esse produto é colorimetricamente determinado, tratando o acetato de etila com o reativo de Erlich (p-dimetilaminobenzaldeído).

O ALA é mais estável em urina ácida, assim se o exame não for realizado imediatamente após a coleta, o pH urinário deverá ser ajustado entre 4,0 a 4,5 com uma solução de ácido acético 8 M (10 mL/L de urina). Além disso, o ALA é fotossensível, e portanto é recomendável que a coleta de urina seja feita em frasco âmbar.

Trabalhadores tabagistas podem apresentar níveis de ALA-U discretamente aumentados devido à presença de

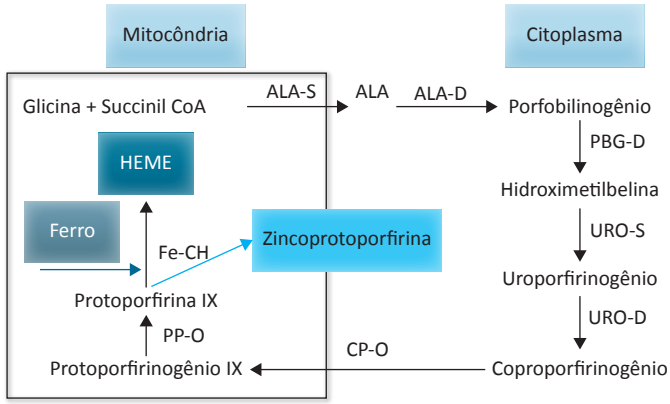


Figura 19.1 Síntese do HEME* no tecido hematopoiético que sofre interferência durante exposição crônica ao chumbo. *ALA = ácido δ-aminolevulínico; ALA-S =ácido δ-aminolevulínico sintetase; ALA-D = ácido δ-aminolevulínico desidratase; PBG-D = porfobilinogênio desaminase; URO-S = uroporfirinogênio sintetase; URO-D = uroporfirinogênio descarboxilase; CP-O = coproporfirinogênio oxidase; PP-O = protoporfirinogênio IX oxidase; Fe-CH = ferro quelatase; o Pb ao inibir essa última enzima provoca a formação da zincoprotoporfirina. Os precursores do HEME ou enzimas que podem ser usadas como indicadores de exposição ao chumbo estão evidenciadas em negrito.
Fonte: Adaptada de Ajioka *et al.,* 2006 e Dal Molin *et al.,* 2006.

chumbo nos cigarros. Por outro lado, a deficiência de vitamina B6, por participar do passo inicial da síntese do heme, pode provocar níveis mais baixos de ALA-U.

Outro indicador para avaliação da exposição ocupacional ao chumbo é a zincoprotoporfirina (ZPP - ou protoporfirina *zinfigco*). Durante a síntese do HEME (Figura 19.1) no tecido hematopoiético, o chumbo inibe várias enzimas, dentre elas a ferroquelatase, havendo acúmulo de protoporfirina IX e sua consequente quelação com o zinco.

A ZPP correlaciona-se com a concentração sanguínea de chumbo, entretanto, níveis elevados de ZPP podem ser também observados em pessoas com baixas concentrações de hemoglobina e/ou naquelas com anemia ferropriva.

Três procedimentos analíticos para a determinação de ZPP em amostras de sangue são mais comumente utilizados: extração ácida, extração neutra com solventes, e hematofluorimetria. Na extração ácida, o zinco é liberado da ZPP produzindo protoporfirina livre, que é medida por fluorimetria ou absortividade. Na extração com solvente neutro (ou com o emprego de ácido orgânico fraco), a ZPP é extraída por CLAE e a ZPP é medida por fluorimetria. A hematofluorimetria é o método que detecta a fluorescência emitida pelos eritrócitos, que contém ZPP. Este último método é rápido e a amostra não necessita de tratamento prévio. Uma gota de sangue, como a obtida por punção digital, pode ser empregada (medição sendo feita no local de coleta).

A concentração de ZPP medida por fluorimetria pode estar falsamente aumentada devido à influência de alguns fármacos, como por exemplo: amoxiciclina, doxiciclina, doxorrubicina, extrato de *Gingko biloba,* metotrexato e succinato ferroso. Concentrações mais elevadas de bilirrubinas e riboflavina também podem provocar o mesmo efeito, e tais interferências podem ser eliminadas pela lavagem dos eritrócitos antes do exame.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Ajioka RS, Phillips JD, Kushner JP. Biosynthesis of heme in mammals. Biochim Biophys Acta. 2006;1763(7):723-36.
2. Alves ANL, Sumita NM, Fortini AS, et al. Improvement of an HPLC method to determine urinary δ-aminolevulinic acid. J Bras Patol Med Lab. 2010;46(3):171-4.
3. Amorim LC A, Alvarez-Leite E. Determinação do orto cresol urinário por cromatografia em fase gasosa utilizando-se de ionização de chama. Rev Farm Bioquim Univ Sao Paulo. 1996;32(1):15-20.
4. Angerer J, Krämer A. Occupational chronic exposure to organic solvents. XVI. Ambient and biological monitoring of workers exposed to toluene. Int Arch Occup Environ Health. 1997;69(2):91-6.
5. Araujo UC, Piveta FR, Moreira JC. Avaliação da exposição ocupacional ao chumbo: proposta de uma estratégia de monitoramento para prevenção dos efeitos clínicos e subclínicos. Cad Saude Publica. 1999;15(1):123-31.
6. Ashraf MW. Levels of heavy metals in popular cigarette brands and exposure to these metals via smoking. TheScientificWorldJournal [Internet]. 2012 Jan;2012:729430. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3320036/pdf/TSWJ2012-729430.pdf
7. Avogbe PH, Ayi-Fanou L, Autrup H, et al. Ultrafine particulate matter and high-level benzene urban air pollution in relation to oxidative DNA damage. Carcinogenesis. 2005;26(3):613-20.
8. Bachovchin DA, Cravatt BF. The pharmacological landscape and therapeutic potential of serine hydrolases. Nat Rev Drug Discov. 2012;11(1):52-68.
9. Battisti V, Bagatini MD, Maders LDK, et al. Cholinesterase activities and biochemical determinations in patients with prostate cancer: influence of Gleason score, treatment and bone metastasis. Biomed Pharmacother. 2012;66(4):249-55.
10. Beutler E, West C. Simplified Determination of Carboxyhemoglobin. Clin Chem. 1984;30(6):871-4.

11. Blumberg WE, Eisinger J, Lamola AA, et al. The Hematofluorometer. Clin Chem. 1977;23(2):270-4.
12. Bonner MR, Lee WJ, Sandler DP, et al. Occupational Exposure to Carbofuran and the Incidence of Cancer in the Agricultural Health Study. Environ Health Perspect. 2005;113(3):285-9.
13. Boogaard PJ, van Sittert NJ. Biological monitoring of exposure to benzene: a comparison between S-phenylmercapturic acid, trans, trans-muconic acid, and phenol. Occup Environ Med. 1995;52(9):611-20.
14. Bradberry SM, Aw T-C, Williams NR, et al. Occupational methaemoglobinaemia. Occup Environm Med. 2001;58(9):611-5.
15. Bradberry SM, Aw T-C, Williams NR, et al. Occupational methaemoglobinaemia. Occup Environm Med. 2001;58(9):611-5.
16. Brasil, Ministério do Trabalho e do Emprego, Portaria 3.214 de 08 de junho de 1978, Norma Regulamentadora no15: Agentes Químicos Cuja Insalubridade é Caracterizada por Limite de Tolerância e Inspeção no Local de Trabalho, Brasília, DF, publucada no D.O.U de 06 de julho de 1978
17. Brasil, Ministério do Trabalho e do Emprego, Portaria GM 3.214 de 08 de junho de 1978, Norma Regulamentadora no 7: Controle Médico de Saúde Ocupacional, Brasília, DF, publicada no D.O.U. de 06 de julho de 1978.
18. Brasil, Ministério do Trabalho e do Emprego, Secretaria de Inspeção do Trabalho Departamento de Segurança e Saúde no Trabalho. Portaria no 34, de 20 de dezembro de 2001. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http: //portal.mte.gov.br/legislacao/portaria-n-34-de-20-12-2001-1.htm
19. Brasil, Ministério do Trabalho e do Emprego, Secretaria de Segurança e Saúde do Trabalho, Portaria no14, de 20 de dezembro de 1995 – anexo 13-A - Benzeno da Norma Regulamentadora Número 15. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://portal.mte.gov.br/data/files/8A7C816A33EF4599 01342405FB3B7767/NR-15%20(Anexo%20n.%C2%BA%20 13-A)%20Benzeno%202011(II).pdf
20. Brasil, Ministério do Trabalho e do Emprego, Secretaria de Segurança e Saúde do Trabalho, Portaria 24, de 29 de dezembro de 1994, Brasília, DF, publicada no D.O.U de 30 de dezembro de 1994.
21. Çokugra AN. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. Turk J Biochem. 2003;28(2):54-61.
22. Counter SA, Buchanan LH, Ortega F, et al. Comparative analysis of zinc protoporphyrin and blood lead levels in lead-exposed Andean children. Clin Biochem. 2007;40(11):787-92
23. Cruz-Landeira A, Bal MJ, Quintela O, et al. Determination of methemoglobin and total hemoglobin in toxicological studies by derivative spectrophotometry. J Anal Toxicol. 2002;26(3):67-72.
24. Cwiertnia MM, Alcântara VM, Réa RR, et al. Butyrylcholinesterase and diabetes mellitus in the CHE2 C5- and CHE2 C5+ phenotypes. Arq Bras Endocrinol Metab. 2010;54(1):60-7.
25. Dal Molin F, Paoliello MMB, De Capitani EMD. A zincoprotoporfirina como indicador biológico na exposição ao chumbo: uma revisão. Rev Bras Toxicologia. 2006;19(2):71-80.
26. Darreh-Shori T, Soininen H. Effects of Cholinesterase Inhibitors on the Activities and Protein Levels of Cholinesterases in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer's Disease: A Review of Recent Clinical Studies. Curr Alzheimer Res. 2010;7(1):67-73.
27. Darvesh S, McDonald RS, Penwell A, et al. Structure-activity relationships for inhibition of human cholinesterases by alkyl amide phenothiazine derivatives. Bioorg Med Chem. 2005;13(1):211-22.
28. De Capitani EM, Paoliello MMB, Almeida GRC. Fontes de Exposição Humana ao Chumbo no Brasil. Medicina. 2009;42(16):311-8.
29. De Peyster A, Willis WO, Liebhaber M. Cholinesterase Activity in Pregnant Women and Newborns. J Toxicol Clin. 1994;32(6):683-96.
30. Dietz AA, Rubinstein HM, Lubrano T. Colorimetric Determination of Serum Cholinesterase and Its Genetic Variants by the Propionyithiocholine- Dithiobis(nitrobenzoic Acid) Procedure. Clin Chem. 1973;19(11):1309-13.
31. Ducos P, Gaudin R, Robert A, et al. Improvement in HPLC analysis of urinary trans, trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure. Int Arch Occup Environ Health. 1990;62(7):529-34.
32. Dutra F, Bechara EJH. Bioquímica e Ação Citotóxica de Alfa Aminocetonas Endógenas. Quim Nova. 2005;28(3):483-91.
33. Eisenberg DP. Neurotoxicity and Mechanism of Toluene Abuse. Einstein Quart J Biol Med. 2003;19:150-9.
34. Ellman GL. Tisssue Sulfhydryl Groups. Arch Biochem Biophys. 1959;82:70-7.
35. Eskenazi B, Marks AR, Bradman A, Harley K, et al. Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children. Environ Health Perspect. 2007;115(5):792-8.
36. Fewtrell L. Drinking-Water Nitrate, Methemoglobinemia, and Global Burden of Disease: A Discussion. Environ Health Perspect. 2004;112(14):1371-4.
37. Fonseca EP, Johann I, Alegretti AP, et al. Interferência do consumo de Chimarrão nos níveis de ácido hipúrico urinário. RBAC. 2006;38(3):163-5.
38. Fustinoni S, Mercadante R, Campo L, et al. Comparison Between Urinary o Cresol and Toluene as Biomarkers of Toluene Exposure. J Occup Environ Hyg. 2007;4(1):1-9.
39. Gatley SJ. Activities of the enantiomers of cocaine and some related compounds as substrates and inhibitors of plasma butyrylcholinesterase. Biochem Pharmacol. 1991;41(8):1249-54.
40. Hampson NB, Ecker ED, Scott KL. Use of a noninvasive pulse CO-oximeter to measure blood carboxyhemoglobin levels in bingo players. Respir Care. 2006;51(7):758-60.
41. Hastka J, Lasserre JJ, Schwarzbeck A, et al. Washing Erythrocytes to Remove Interferents in Measurements of zinc protoporphyrin by Font-Face Hematofluorometry. Clin Chem. 1992;38(11):2184-9.
42. Hegesh E, Gruener N, Cohen S, et al. A sensitive micromethod for the determination of methemoglobin in blood. Clin Chim Acta. 1970;30:679-82.
43. Hisano M, Suzuki R, Sago H, et al. Vitamin B6 deficiency and anemia in pregnancy. Eur J Clin Nutr. 2010;64(2):221-3.
44. Hofmann JN, Keifer MC, De Roos AJ, et al. Occupational determinants of serum cholinesterase inhibition among organophosphate-exposed agricultural pesticide handlers in Washington State. Occup Environ Med. 2010;67(6):375-86.
45. Hofmann JN, Keifer MC, Furlong CE, et al. Serum cholinesterase inhibition in relation to paraoxonase-1 (PON1) status among organophosphate-exposed agricultural pesticide handlers. Environ Health Perspect. 2009;117(9):1402-8.
46. Hord NG, Tang Y, Bryan NS. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. Am J Clin Nutr. 2009;90(1):1-10.
47. Hosbino ACH, Pacheco-Ferreira H, Taguchi CK, et al. Estudo da ototoxicidade em trabalhadores expostos a organofosforados. Rev Bras Otorrinolaringol. 2008;74(6):912-8.
48. Jardim ANO, Caldas ED. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. Quim Nova. 2009;32(7):1898-909.

49. Jone CM, Wu AHB. An Unusual Case of Toluene-Induced Metabolic Acidosis. Clin Chem. 1988;34(12):2596-9.
50. Kalow W, Genest K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase; determination of dibucaine numbers. Can J Biochem Physiol. 1957;35(6):339-46
51. Kamel F, Engel LS, Gladen BC, et al. Neurologic Symptoms in Licensed Private Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. Environ Health Perspect. 2005;113(7):877-82.
52. Kao LW, Nañagas KA. Carbon monoxide poisoning. Med Clin N Am. 2005;89(6):1161-94.
53. Kim K, Eom SY, Yim DH, et al. Urinary Hippuric Acid and trans, trans-Muconic Acid Levels According to Commuting Mode and Duration, Residential Environment, and Intake of Preservative-Added Foods and Beverages in University Students. Korean J Occup Environ Med. 2012;24(1):61-71.
54. Kimura A, Nishimura K, Miyasaka S, et al. Case Report A Case of Acute Arterial Thrombosis Caused by Nephrotic Syndrome. Ann Vasc Dis. 2010;3(1):68-70.
55. Kinoshita A, Nakayama Y, Kitayama T, et al. Simulation study of methemoglobin reduction in erythrocytes. FEBS Journal [Internet]. 2007 Mar 19;274(6):1449-58. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2007.05685.x
56. Klaassen CD, Watkins III JB. Casarett and Doull's Essentials of Toxicology. New York: McGraw-Hill, 2003. p.168.
57. Kortgen A, Paxian M, Werth M, et al. Prospective assessment of hepatic function and mechanisms of dysfunction in the critically ill. Shock. 2009;32(4):358-65.
58. Lee BK, Jeung KW, Lee HY, et al. Mortality rate and pattern following carbamate methomyl poisoning. Comparison with organophosphate poisoning of comparable toxicity. Clin Toxicol. 2011;49(9):828-33.
59. Li B, Stribley JA, Ticu A, et al. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. J Neurochem. 2000;75(3):1320-31. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10936216
60. Lockridge, O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in clinic, and potential therapeutic use. Pharmacology and Therapeutics, 148: 34-46, 2015
61. Luchini PD, Leyton JF, Strombech MLC, et al. Validation of a Spectrophotometric Method for Quantification of Carboxyhemoglobin. J Anal Toxicol. 2009;33:540-4.
62. Machado JMH, Costa DF, Cardoso LM, et al. Alternativas e processos de vigilância em saúde do trabalhador relacionados à exposição ao benzeno no Brasil. Ciência e Saúde Coletiva. 2003;8(4):913-21.
63. Mansouri A, Lurie A. Methemoglobinemia. Am J Hematol. 1993;42(1):7-12.
64. Martins I, Siqueira MEPB. Trans, trans-muconic acid in urine samples collected in three periods from benzene handling workers in a Brazilian refinery. RBCF. 2004;40(2):197-202
65. Medeiros AM, Bird MG, Witz G. Potential biomarkers of benzene exposure. J Toxicol Environ Health. 1997;51(6):519-39.
66. Meeker JD, Ryan L, Barr DB, et al. Exposure to Nonpersistent Insecticides and Male Reproductive Hormones. Epidemiology. 2006;17(1):61-8.
67. Menezes MD, Balbão MS, Siqueira MEB, et al. Influência do hábito de fumar na excreção urinária do ácido. RBCF. 2008;44(3):459-64.
68. Midio AF, Martins D. Toxicologia de Alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 2000. p.295.
69. Moraes ECF, Sznelwar RB, Fernicola N. Manual de Toxicologia Analítica. São Paulo: Livraria Roca Ltda, 1991. p.229.
70. Naoum PC, Radispiel J, Moraes MS. Dosagem espectrométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. Rev Bras Hematol Hemoter. 2004;26(1):19-22.
71. Nicolet Y, Lockridge O, Masson P, et al. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. J Biol Chem. 2003;278(42):411417.
72. Oga S, Camargo MMA, Batistuzzi JAO. Fundamentos de Toxicologia. 3.ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda, 2008. p.696.
73. Oliveira MVC, Oliveira TR, Pereira CAC, et al. Tabagismo em pacientes internados em um hospital geral. J Bras Pneumol. 2008;34(11):936-41.
74. Oliveira-Silva JJ, Alves SR, Inacio AF, et al. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. Hum Exp Toxicol. 2000;19(3):173-7.
75. Omaye ST. Metabolic modulation of carbon monoxide toxicity. Toxicology. 2002;180:139-50.
76. Paula FCS, Silveira JN, Alvarez-Leite EM. Validação do método de Ducos modificado para a determinação do ácido trans, trans-mucônico urinário. RBCF. 2003;39(1):63-9.
77. Paz-y-Miño C, Bustamante G, Sánchez ME, et al. Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. Environ Health Perspect. 2002;110(11):1077-80.
78. Pires DX, Caldas ED, Recena MCP. Uso de agrotóxicos e suicídios no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. Cad Saúde Pública. 2005;21(2):598-605.
79. Pohanka M, Hrabinova M, Kuca K, et al. Assessment of Acetylcholinesterase Activity Using Indoxylacetate and Comparison with the Standard Ellman's Method. Int J Mol Sci. 2011;12(4):2631-40.
80. Prasad DRM, Gouda HS, Hallikeri VR. Plasma cholinesterase: double-edged parameter in the diagnosis of acute organophosphorus poisoning. Med Sci Law. 2010;50(3):159-60
81. Reuss R, Pratt S. Accumulation of carbon monoxide and carbon dioxide in stored canola. J Stored Prod Res. 2001;37(1):23-34.
82. Sakai T. Biomarkers of Lead Exposure. Ind Health. 2000;38:127-42.
83. Salvi RM, Lara DR, Ghisolfi ES, et al. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. Toxicol Sci. 2003;72(2):267-71.
84. Santos UP, Gannam S, Abe JM, et al. Emprego da determinação de monóxido de carbono no ar exalado para a detecção do consumo de tabaco. J Pneumol. 2001;27(5):231-6.
85. Shihana F, Dawson AH, Dissanayake DM. Method of stabilizing blood for the determination of methemoglobin. J Clin Lab Anal. 2011;25(5):366-8.
86. Siow RCM, Sato H, Mann GE. Heme oxygenase – carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide ? Cardiovasc Res. 1999;41:385-94.
87. Siqueira MEPB, Martins I, Costa AC, et al. Valores de Referência para Carboxiemoglobina. Rev Saúde Pública. 1997;31(6):618-23.
88. Soares WL, Freitas EAV, Coutinho JAG. Trabalho rural e saúde: intoxicações por agrotóxicos no município de Teresópolis - RJ. RER. 2005;43(4):685-701.

89. Sundin AM, Larson JE. Rapid and sensitive method for the analysis of carbon monoxide in blood using gas chromatography with flame ionisation detection. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2002;766(1):115-21.
90. Teves MLI. Benzeno. 2003. p.1-3. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.oswaldocruz.br/download/fichas/Benzeno2003.pdf
91. Tomokuni K, Ogata M. Simple method for determination of urinary -aminolevulinic acid as an index of lead exposure. Clin Chem. 1972;18(12):1534-8.
92. Tong S, Von Schirnding YE, Prapamontol T. Environmental lead exposure: a public health problem with global dimensions. Bulletin of the World Health Organization. [Internet] 2000;78(9):1068-77. [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2560844/pdf/11019456.pdf
93. USA, Department of Health and Human Services, National Institute for Ocuppational Safety and Health. Workplace Safety and Health Topics - Carbon Monoxide. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.cdc.gov/niosh/topics/coboating/
94. Valle A, O'Connor DT, Taylor P, et al. Butyrylcholinesterase: association with the metabolic syndrome and identification of 2 gene loci affecting activity. Clin Chem. 2006;52(6):1014-20.
95. Viby-Mogensen J, Hanel HK, Hansen E, et al. Serum cholinesterase activity in burned patients. I: biochemical findings. Acta Anaesthesiologica Scandinavica. 1975;19(3):159-68.
96. Walch SG, Lachenmeier DW, Sohnius EM, et al. Rapid Determination of Carboxyhemoglobin in Postmortem Blood using Fully-Automated Headspace Gas Chromatography with Methaniser and FID. Open Toxicol J. 2010;4:21-5.
97. Weaver LK. Carbon Monoxide Poisoning. N Engl J Med. 2009;360:1217-25.
98. Whittaker M, Britten JJ, Wicks RJ. Inhibition of the Plasma Cholinesterase Variants By Propranolol. Br J Anaesth. 1981;53(5):511-6
99. Whittaker M, Crawford JS, Lewis M. Some observations of levels of plasma cholinesterase activity within an obstetric population. Anaesthesia. 1988;43(1):42-5.
100. WHO, Preventing Disease Through Healthy Environments. Exposure To Highly Hazardous Pesticides: A Major Public Health Concern. WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland. 2010. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.who.int/ipcs/features/hazardous_pesticides.pdf
101. Whyatt RM, Camann D, Perera FP, et al. Biomarkers in assessing residential insecticide exposures during pregnancy and effects on fetal growth. Toxicol Appl Pharmacol. 2005;206(2):246-54.
102. Wildt K, Berlin M, Isberg PE. Monitoring of zinc protoporphyrin levels in blood following occupational lead exposure. Am J Ind Med. 1987;12(4):385-98.
103. Worek F, Eyer P, Thiermann H. Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: a versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning. Drug Test Anal. 2012;4(3-4):282-91.
104. Yoon BK, Kim DK, Kang Y, et al. Hormone replacement therapy in postmenopausal women with Alzheimer's disease: a randomized, prospective study Objective. Fertil Steril. 2003;79(2):274-80.
105. Zedler BK, Kinser R, Oey J, et al. Biomarkers of exposure and potential harm in adult smokers of 3-7 mg tar yield (Federal Trade Commission) cigarettes and in adult non-smokers. Biomarkers. 2006;11(3):201-20.
106. Zheng G, Tian L, Liang Y, et al. δ-Aminolevulinic acid dehydratase genotype predicts toxic effects of lead on workers' peripheral nervous system. Neurotoxicology. 2011;32(4):374-82.

20

capítulo

Flavia Valladão Thiesen

Monitoramento Terapêutico

INTRODUÇÃO

Monitoramento terapêutico (MT) pode ser definido como o uso do monitoramento dos fármacos ou de seus metabólitos nos fluidos corporais como ferramenta auxiliar à terapia. Envolve a dosagem dos níveis do fármaco e a interpretação dos seus resultados, de modo a assegurar o benefício clínico desse instrumento.

Um princípio fundamental da farmacologia clínica é que os efeitos dos fármacos são causados pela sua concentração no local de ação – não pela sua dose. Essa concentração não pode ser medida de forma rotineira, porém a concentração dos fármacos no sangue ou plasma, a qual é mais facilmente determinada, pode se correlacionar melhor com os efeitos terapêuticos ou tóxicos do que a dose administrada. Para fármacos que a medida da concentração sanguínea ou plasmática representa de forma adequada a concentração no local de ação, particularmente nos casos em que não há uma forma simples ou sensível de medir o efeito, é indicado o MT.

O intervalo ou faixa terapêutica representa a relação entre a concentração mínima efetiva e a concentração tóxica mínima de um fármaco. O MT é comumente recomendado para otimizar o tratamento com diversos medicamentos, permitindo que seja realizado seu ajuste de doses a fim de atingir o intervalo terapêutico e, desse modo, a resposta terapêutica ótima, reduzindo o risco da ocorrência de reações adversas ou de níveis subterapêuticos.

Porém, para que o MT tenha utilidade, os seguintes critérios devem ser atendidos:

- o intervalo terapêutico deve ter sido previamente estabelecido;
- há baixa correlação entre a dose administrada e a concentração sanguínea ou plasmática;
- o fármaco possui pequena variabilidade intrapaciente no estado de equilíbrio.

Indicações para realização de MT

A determinação dos níveis sanguíneos dos fármacos envolve um investimento, por isso a necessidade da realização do MT deve ser bem justificada. De modo geral, ele é recomendado nos casos em que os resultados apresentarão impacto clínico significativo, como as situações a seguir:

- Ajuste de dose de fármacos cuja resposta não pode ser rapidamente avaliada clinicamente, como uso de antimicrobianos, imunossupressores, anticonvulsivantes, tuberculostáticos e antirretrovirais. No caso de antimicrobianos, antimicóticos e antivirais, o MT também contribui para reduzir o desenvolvimento de resistência.
- Uso de fármacos que apresentam ampla variação farmacocinética interindividual, com consequente dificuldade para prever a concentração com base na dose administrada ou ajustar a dose com base na resposta, pois o efeito clínico desejado é difícil de avaliar clinicamente ou por parâmetros laboratoriais de rotina.
- Emprego de fármacos com pequeno intervalo terapêutico, como lítio e digoxina.
- Prevenção de efeitos adversos ou de toxicidade, caso dos aminoglicosídeos, aumentando a eficácia do tratamento. Com a redução dos efeitos adversos, há também, diminuição de custos por parte do sistema de saúde.
- Muitas vezes, uma intoxicação pode ser diagnosticada clinicamente, porém, efeitos adversos como letargia, anorexia e diarreia são inespecíficos, e pode ser difícil definir a relação causa-efeito. O MT pode ser útil para identificar se esses sintomas estão relacionados ao fármaco dosado ou a outras causas.
- Avaliar a não adesão ao tratamento, apesar de esta não ser a indicação primária do MT.
- No uso de polifarmácia podem ocorrer interações medicamentosas que afetem os níveis sanguíneos dos fármacos. O MT contribui para identificar se há necessidade de ajuste de dose dos fármacos envolvidos.
- Pacientes nos quais a farmacocinética não está bem estudada, como aqueles com doenças terminais, comorbidades importantes, idosos e crianças ou pacientes nos extremos do tamanho corporal. No caso de idosos, o envelhecimento está associado à redução da filtração glomerular e da atividade de enzimas responsáveis pela biotransformação, reduzindo a eliminação

dos fármacos. Pacientes com câncer podem apresentar flutuações nas funções renal e hepática durante a patologia e seu tratamento. Nesses pacientes pode haver alterações da farmacocinética, que resultem em aumento ou redução da eliminação, assim como do volume de distribuição, tornando difícil prever a exposição ao fármaco.

- Para orientar a terapia farmacológica em gestantes, nas quais as alterações fisiológicas podem levar a alterações farmacocinéticas, que resultam em dificuldade para prever a dose apropriada de um fármaco. Porém, é importante destacar que os intervalos terapêuticos, na maior parte dos casos, foram estabelecidos em populações que não incluíam gestantes.

No entanto, o MT só deve ser realizado quando métodos de análise exatos, precisos e específicos estiverem disponíveis, a um custo razoável, e em tempo adequado para disponibilizar os resultados, de forma a permitir sua aplicação clínica quando níveis muito altos ou baixos do fármaco forem identificados.

Amostras empregadas

Plasma ou soro são as amostras preferenciais para realizar MT, apesar de necessitarem de coleta especializada. Alguns fármacos, como os imunossupressores, estão concentrados nos eritrócitos e, por isso, sangue total, coletado com o anticoagulante apropriado, é mais adequado para a realização das dosagens. Quando barreiras à base de gel separador são empregadas, deve ser observado se seu uso não causa interferência nos resultados.

O fluido oral é uma matriz interessante, pois sua coleta não é invasiva e apenas a fração livre do fármaco está presente. No entanto, o MT em fluido oral ainda apresenta aplicação limitada, pois é importante assegurar-se de que a concentração fluido oral/plasma é constante, e não é afetada pelo pH e fluxo salivar.

Amostras de sangue seco, coletadas com lanceta e transferidas para um papel de filtro a partir de sangue de um dedo, são uma alternativa à punção venosa. Têm como vantagens o fato de sua coleta ser menos invasiva e o volume necessário ser menor. São indicadas para MT em portadores de doenças infecciosas, como tuberculose e HIV, pacientes acamados ou para hospitais sem infraestrutura bioanalítica avançada, pois o armazenamento da amostra é a temperatura ambiente e o transporte não envolve risco biológico. No entanto, ainda são poucos os laboratórios que dispõem de métodos para realizar análise com esse tipo de amostra.

Coleta de amostras

O estado de equilíbrio ou estado estacionário ocorre quando a taxa de absorção do fármaco equivale à sua taxa de eliminação no intervalo de doses, e a concentração plasmática geralmente é proporcional à concentração nos receptores. Geralmente são necessárias pelo menos quatro meias-vidas de eliminação para atingir o estado de equilíbrio. Para que uma amostra de sangue seja considerada adequada para o MT é essencial que ela tenha sido coletada após o estado de equilíbrio haver sido atingido, a menos que haja preocupação quanto à presença de toxicidade. Na prática, aguarda-se no mínimo cinco meias-vidas de tempo de tratamento para a coleta de sangue de pacientes que necessitam MT (Figura 20.1).

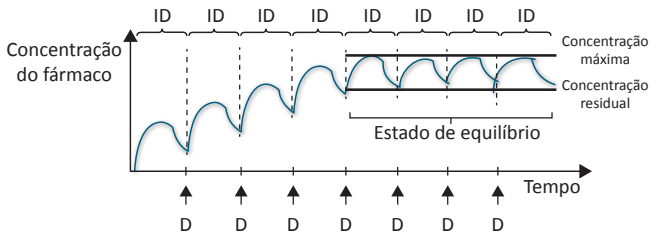


Figura 20.1 Representação da concentração sanguínea de fármaco administrado de forma regular. ID: intervalo de doses. D: administração de dose.
Fonte: Santos SRCJ, 2008.

Outra questão importante em relação à coleta da amostra de sangue é que a mesma deve ser realizada em um momento definido em relação à última administração do fármaco, uma vez que ocorrem alterações na concentração do fármaco ao longo do intervalo de doses. O ponto menos sujeito a variações no intervalo de doses é aquele imediatamente antes da próxima dose, chamado concentração pré-dose, concentração residual ou vale, o qual é comumente indicado pela facilidade para sua identificação. É importante observar o horário exato para realização da coleta, pois quando a punção ocorre mais de 30 minutos antes da próxima dose podem ocorrer erros na interpretação dos resultados, por isso, é indispensável o treinamento da equipe de enfermagem e de flebotomistas para que a coleta ocorra no momento indicado.

Para fármacos com meia-vida longa, as amostras podem ser coletadas a qualquer momento do intervalo de doses, pois há pequena variação em sua concentração ao longo desse período. Alguns antibióticos, como os aminoglicosídeos, precisam ser dosados no pico (concentração sanguínea máxima). Nesse caso, a concentração determinada reflete a dose do fármaco que foi administrada, enquanto os níveis dosados no vale refletem o acúmulo do fármaco no organismo (Quadro 20.1).

Métodos de análise

A escolha do método de análise laboratorial para determinado fármaco ou situação clínica depende da equipe e dos equipamentos disponíveis, bem como da natureza do serviço.

Quadro 20.1 Intervalo terapêutico, momento indicado para coleta e ligação a proteínas plasmáticas de fármacos frequentemente submetidos a MT.

Fármaco	Momento para coleta	Intervalo terapêutico	Ligação a proteínas plasmáticas (%)	Observações
Carbamazepina	Vale	4-12 ug/mL	70 a 90	
Fenitoína	Preferencial-mente Vale	10-20 ug/mL	90 a 95	Em pacientes portadores de insuficiência renal os metabólitos da fenitoína podem deslocá-la de sua ligação a proteínas plasmáticas. Níveis terapêuticos na saliva: 1-2 mg/L.
Fenobarbital	2 a 4h após administração	20-40 ug/mL	30 a 45	
Ácido valproico	Vale	50-100 ug/mL	93	
Digoxina	6 a 8h após administração do fármaco	0,8-2,0 ng/mL	25	
Amicacina	Vale Pico: 1h após administração	Vale: 1-4 ug/mL Pico: 15-25 ug/mL	5	
Cloranfenicol	Vale Pico: 1h após administração	Vale: 5-10 mg/L; Pico: 10-20 mg/L; Infusão contínua: 5-15 mg/L;	53	
Gentamicina	Pico: 1h após o início de infusão de 30 minutos	Vale: 0,1-2 mg/L Pico: 7-15 mg/L	5	
Vancomicina	Vale Pico: 1h após administração	Vale: 8-15 mg/L Pico: 20-40 mg/L	<10	
Lítio	Vale	0,6-1,4 mEql/L	0	
Ciclosporina	Vale	0,1-0,4 μg/L	90 a 98	Sangue total (coleta com EDTA) Aproximadamente 50% ligada aos eritrócitos
Ácido micofenólico	Vale	1-3 mg/L	97	
Sirolimus	Vale	1-3 meses após o transplante V ale: 7-10 μg/L Manutenção: Vale: 5-7 μg/L	97	Sangue total (coleta com EDTA)
Tacrolimus	Vale	3-10 μg/L	85	Sangue total (coleta com EDTA)
Teofilina		Adultos: 5-20 mg/L Neonatos: 5-10 mg/L	40	

Fonte: Uges DRA; *et al*., 2008. Roberts JA; *et al*., 2012. Swartling M; *et al*., 2012.

Os imunoensaios são amplamente empregados em MT. São métodos tecnicamente simples, passíveis de automação, realizados em equipamentos frequentemente disponíveis em laboratórios clínicos, e em geral empregam de 5 a 10 uL de amostra. Além disso, a maior parte dos fármacos pode ser analisada diretamente em soro ou plasma, sem necessidade de pré-tratamento prévio. Sua maior desvantagem é a menor especificidade, pois pode haver interferência de componentes endógenos ou de metabólitos e compostos estruturalmente relacionados ao fármaco. Algumas vezes, mesmo um fármaco não relacionado estruturalmente também pode interferir no resultado.

Quando diversos fármacos são empregados simultaneamente ou há necessidade de quantificar o fármaco e seus metabólitos ativos separadamente, técnicas cromatográficas, acopladas ou não à espectrometria, são indicadas. Em comparação aos imunoensaios, essas técnicas são mais demoradas e relativamente caras, exigindo mão de obra especializada. Além disso, o volume de amostra necessário geralmente é maior e seu preparo é laborioso, pois podem ser necessárias etapas como precipitação de proteínas, extração ou derivatização prévias. Técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL/EM) ou sequencial (CL/EM/EM) são mais sensíveis e específicas, sendo a CL/EM/EM considerada o padrão-ouro. No entanto, como também podem sofrer interferência, devem ser cuidadosamente avaliadas. São as técnicas desenvolvidas e validadas.

Interferentes e interpretação dos resultados

Apenas a fração livre dos fármacos interage com os receptores e produz resposta terapêutica, e esta pode ser afetada por fatores como concentração sérica de albumina, deslocamento por interação com outros fármacos e insuficiência renal. Por isso, a identificação da presença dessas situações é importante para fármacos com alta ligação a proteínas plasmáticas, pois, usualmente, as frações livre e ligada são dosadas conjuntamente. No caso do MT de um fármaco com alta ligação a proteínas plasmáticas, se não for percebido que o paciente apresenta níveis reduzidos de proteínas plasmáticas, a concentração livre provavelmente será subestimada. Logo, em algumas situações, a determinação da fração plasmática livre é importante, pois a quantidade de fármaco disponível para atingir o local de ação será maior do que a esperada. As técnicas mais empregadas para separar a fração livre da ligada são a ultracentrifugação e a ultrafiltração, porém a fração livre poucas vezes é determinada na prática clínica, e a maior parte dos métodos para dosar fármacos mede a concentração total do fármaco (fração livre e fração ligada a proteínas plasmáticas). Outra opção para reduzir o impacto deste interferente na interpretação dos resultados, quando houver alteração nos níveis das proteínas plasmáticas e o fármaco possuir alta ligação a proteínas plasmáticas, é calcular a concentração normalizada com base na concentração total do fármaco e no nível de albumina sérica. Neste caso, a concentração normalizada fornecerá uma interpretação mais adequada da concentração medida.

O intervalo terapêutico descreve um intervalo de concentração associado com uma probabilidade razoável de eficácia sem toxicidade excessiva para a maior parte dos pacientes. Porém, a reatividade cruzada, seletividade e sensibilidade dos imunoensaios pode variar entre diferentes fabricantes, mesmo para a mesma técnica. Diversos imunoensaios com diferentes princípios estão disponíveis para a determinação da concentração de fármacos em amostras biológicas. Alguns testes são novos ou sofreram importantes melhorias, outros são baseados em métodos clássicos. No entanto, como a automação laboratorial sofre melhoramentos contínuos por meio de novos sistemas analíticos, os reagentes também são adaptados para as novas plataformas. O fato de o princípio do método ser o mesmo não exclui a necessidade de validar um novo método ou instrumento antes de adotá-lo no laboratório. Por isso, intervalos terapêuticos validados devem acompanhar os resultados emitidos pelos laboratórios clínicos para evitar erros e auxiliar os clínicos a prescrever de forma segura e efetiva.

Devido à reatividade cruzada com metabólitos ativos ou inativos, os imunoensaios geralmente superestimam a concentração de fármacos. Essas diferenças não afetam sua utilidade clínica, mas conferem variabilidade às concentrações registradas e aos intervalos considerados terapêuticos. Metabólitos ativos, como carbamazepina-10,11-epóxido podem contribuir para a resposta terapêutica, mas não são rotineiramente medidos separadamente. Para a maior parte dos pacientes com função renal normal, a concentração do metabólito epóxido no estado de equilíbrio é 15% a 20% da concentração total de carbamazepina. A proporção deste metabólito pode ser significativamente maior em pacientes com intoxicações por cbz, em pacientes com insuficiência renal ou em casos de coadministração de fármacos como ácido valproico. Nesses pacientes, a concentração total de carbamazepina pode estar no intervalo terapêutico recomendado, mas esses pacientes podem apresentar toxicidade relacionada à dose devido a uma dose elevada do epóxido, que não foi detectada pelo imunoensaio, e a reatividade cruzada do epóxido pode variar de 0% a 94%, dependendo do fabricante do imunoensaio. Para dosar separadamente as concentrações do epóxido é necessário empregar técnicas cromatográficas acopladas ou não à espectrometria.

Os resultados de alguns imunoensaios para dosagem de ciclosporina e tacrolimus sofrem interferência de fatores reumatoides e de anticorpos heterocíclicos endógenos, podendo haver também resultados falso-positivos para tacrolimus em pacientes com valores baixos de hematócrito, além de diferenças da interferência do hematócrito no resultado, de acordo com o fabricante do kit. Alguns imunoensaios para digoxina são afetados por fatores endógenos, como níveis elevados de substâncias endógenas imunorreativas tipo digo-

xina e coadministração de espironolactona, um diurético frequentemente associado à digoxina, usado em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva. Esta pode ser a causa de resultados discordantes quando a mesma amostra é submetida à dosagem de digoxina por imunoensaios diferentes.

Para maior confiabilidade e utilidade dos resultados do MT é fundamental que os laboratórios tenham bem-definidos protocolos para coleta e armazenamento das amostras, façam uso de padrões e calibradores, além de aderirem às boas práticas laboratoriais. Mesmo assim, concentrações de fármacos precisam ser interpretadas no contexto da clínica do paciente. Para adequado uso do MT, devem ser consideradas algumas informações básicas para interpretação dos resultados, as quais incluem o momento da coleta da amostra, o momento da última administração do fármaco, o regime de doses e o motivo da indicação de MT. Por isso, antes de realizar o ajuste de dose, é importante considerar se a amostra foi coletada no momento correto em relação à última dose administrada, se o estado de equilíbrio foi atingido, e se o paciente aderiu ao tratamento.

PERSPECTIVAS PARA INDIVIDUALIZAÇÃO DO REGIME TERAPÊUTICO

Há três formas para individualizar a terapia farmacológica. A primeira é por meio do MT, quando busca-se eliminar as diferenças farmacocinéticas. A segunda, por meio da determinação da relação tempo versus efeito biológico no local de ação ou farmacodinâmica (FD). A farmacodinâmica, medida em paralelo com a farmacocinética, pode fornecer informações adicionais ao clínico. Por exemplo, no caso de imunossupressores, poderiam ser realizadas duas abordagens para monitoramento farmacodinâmico: monitoramento enzimático por meio da medida da enzima-alvo do fármaco, caso da determinação de monitoramento da atividade de IMDPH (inosina monofosfato desidrogenase), um biomarcador farmacodinâmico do ácido micofenólico, ou monitoramento imunológico através de respostas imunológicas simuladas ex-vivo. No entanto, até o momento são raros os métodos farmacodinâmicos amplamente investigados disponíveis para uso na prática clínica. Por último, há a farmacogenética, a qual possui grande potencial para individualizar a terapia medicamentosa. Ela permite determinar o perfil do paciente antes mesmo de o tratamento ter início, e é constante durante todo o seu ciclo vital. A definição do perfil farmacogenético de fármacos inibidores da calcineurina (ciclosporina e tacrolimus) vem sendo usada em alguns países como uma extensão da farmacocinética para prever o perfil farmacocinético dos pacientes e permitir que os níveis terapêuticos sejam atingidos mais rapidamente. Porém, uma das maiores limitações do seu uso é a grande variedade possível de polimorfismos genéticos.

Combinar MT e FD, farmacogenética e MT, ou farmacogenética e FD, oferecerá uma melhor forma de individualizar a terapia. A melhor opção, no entanto, dependerá ainda de cada caso e do avanço da ciência. Até o momento, a rotina do MT é preponderante.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O MT contribui para aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade dos fármacos, bem como diminuir os custos associados ao tratamento dos efeitos adversos. É importante ressaltar que o MT não se restringe à dosagem dos níveis sanguíneos dos fármacos, pois a individualização das doses possui dois elementos: a escolha da concentração-alvo e a definição de uma estratégia de intervenção. Os níveis sanguíneos dos fármacos serão usados para realizar a intervenção, ou seja, individualizar as doses. Logo, fica claro que o MT envolve conhecimentos de farmacocinética, definição de estratégias para coleta das amostras, determinação de uma ou mais concentrações por meio de métodos de análise adequados, e a interpretação adequada dos resultados.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Abdullah A, Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis: an update. Drugs. 2014;74(8):839-55.
2. Burger DM. The role of therapeutic drug monitoring in pediatric HIV/AIDS. Ther Drug Monit. 2010;32:269-72.
3. Christians U, Vinks AA, Langman LJ, et al. Impact of laboratory practices on interlaboratory variability in therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs. Ther Drug Monit. 2015;37(6):718-24.
4. Dasgupta A. Impact of interferences including metabolite cross-sreactivity on therapeutic drug monitoring results. Ther Drug Monit. 2012;34:496-506.
5. Ghiculescu RA. Therapeutic drug monitoring: which drugs, why, when and how to do it. Aust Prescr. 2008;31:42-4.
6. Holford NHG, Buclin T. Safe and effective variability — a criterion for dose individualization. Ther Drug Monit. 2012;34:565-8.
7. Kang J, Park YS, Kim SH, et al. Modern methods for analysis of antiepileptic drugs in the biological fluids for pharmacokinetics, bioequivalence and therapeutic drug monitoring. Korean J Physiol Pharmacol. 2011;15(2):67-81.
8. Leite CE, Petersen CO, Lunardelli A, et al. A high-performance liquid chromatography method for the determination of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide and its comparison with chemiluminescent immunoassay. Clin Chem Lab Med. 2009;47(4):458-63
9. Matsui DM. Therapeutic drug monitoring in pregnancy. Ther Drug Monit. 2012;34:507-11.
10. Moyer TP, McMillin GA. Drogas terapêuticas. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz fundamentos de química clínica. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p.554-74.
11. Musteata FM. Calculation of normalized drug concentrations in the presence of altered plasma protein binding. Clin Pharmacokinet. 2012;51(1):55-68.
12. Norris RL, Martin JH, Thompson E, et al. Current status of therapeutic drug monitoring in Australia and New Zealand: a need for improved assay evaluation, best practice guidelines, and professional development. Ther Drug Monit. 2010;32:615-23.
13. Pretorius E, Klinker H, Rosenkranz B. The role of therapeutic drug monitoring in the management of patients with hu-

man immunodeficiency virus infection. Ther Drug Monit. 2011;33:265-74.
14. Roberts JA, Norris R, Paterson DL, et al. Therapeutic drug monitoring of antimicrobials. Br J Clin Pharmacol. 2012 Jan;73(1):27-36.
15. Samsonsen C, Reimers A, Brathen G, et al. Nonadherence to treatment causing acute hospitalizations in people with epilepsy: an observational, prospective study. Epilepsia. 2014;55(11):e125-128.
16. Santos SRCJ. Monitorização terapêutica. In: Moreau RLM, Siqueira MEPB. Toxicologia analítica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.91-9.
17. Shipkova M, Petrova DT, Rosler AE, et al. Comparability and imprecision of 8 frequently used commercially available immunoassays for therapeutic drug monitoring. Ther Drug Monit. 2014;36(4):433-41.
18. Sotgiu G, Alffenaar JWC, Centis R, et al. Therapeutic drug monitoring: how to improve drug dosage and patient safety in tuberculosis treatment. Int J Inf Dis. 2015;32:101-4.
19. Suchánková H, Machacová M.Vancomycin therapeutic drug monitoring in clinical practice. Clin Therap. 2015;37(8S):e107-108.
20. Swartling M, Gupta R, Dudas V, et al. Short term impact of guidelines on vancomycin dosing and therapeutic drug monitoring. Int J Clin Pharm. 2012;34:282-5.
21. Thi MTN, Mourad M, Capron A, et al. Plasma and intracellular pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of mycophenolic acid in de novo kidney transplant patients. Clin Biochem. 2015;48:401-5.
22. Uges DRA, Hallworth M, Moore C, et al. Clinical toxicology, therapeutic drug monitoring, in utero exposure to drugs of abuse. In: Jickells S, Negrusz A. Clarke´s analytical forensic toxicology. London: Pharmaceutical Press, 2008. p.219-62.
23. Van der Elst KCM, Span LFR, van Hateren K, et al. Dried blood spot analysis suitable for therapeutic drug monitoring of voriconazole, fluconazole and posaconazole. Antimicrob Agent Chemother. 2013:57(10):4999-5004.
24. Van Rossum HH, de Fijter JW, van Pelt J. Pharmacodynamic monitoring of calcineurin inhibition therapy: principles, performance, and perspectives. Ther Drug Monit. 2010;32(1):3-10.
25. Weber LT. Therapeutic drug monitoring in pediatric renal transplantation. Pediatr Nephrol. 2015;30:253-65.
26. Winston A, Jose S, Gibbons S, et al. Effects of age on antiretroviral plasma drug concentration in HIV-infected subjects undergoing routine therapeutic drug monitoring. J Antimicrob Chemother. 2013;68(6):1354-9.
27. Zhang Z, Dong W, Yang X, et al. The influence of plasma albumin concentration on the analysis methodology of free valproic acid by ultrafiltration and its application to therapeutic drug monitoring. Ther Drug Monit. 2015;37(6):776-82.

PARTE

6

Imunologia

Ana Lígia Bender
Ana Paula Duarte de Souza
Fernando Thomé Kreutz

Ana Lígia Bender ▪ Ana Paula Duarte de Souza ▪ Fernando Thomé Kreutz

Imunidade Celular

INTRODUÇÃO

Imunologia é a ciência que estuda os eventos que ocorrem quando o organismo entra em contato com microrganismos ou outras moléculas capazes de induzir resposta imune. Desde Edward Jenner, pioneiro nos estudos de vacinação no século XVIII, o estudo do sistema imune contribui com o desenvolvimento de vacinas e tratamentos para diversas doenças, além de importantes ferramentas que permitem o diagnóstico clínico laboratorial.

A imunidade pode ser didaticamente dividida em inata e adaptativa. A imunidade inata é a primeira linha de defesa dos indivíduos contra patógenos, e as células envolvidas nessa resposta são: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos e células dendríticas, as quais têm funções fagocíticas e de secreção de substâncias microbicidas, ao passo que a imunidade adaptativa consiste da resposta de linfócitos T (celular) e de linfócitos B (humoral) abordadas neste capítulo.

A imunidade celular é um elemento central do sistema imune adaptativo, onde os linfócitos T antígeno específicos atuam eliminando vírus, bactérias, parasitas e células malignas. Antígenos são moléculas complexas, como proteínas ou carboidratos, que podem induzir uma resposta imune. Os linfócitos T também podem reconhecer de forma aberrante antígenos próprios e contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes.

A resposta celular mediada por linfócitos T é um processo que inclui uma resposta primária iniciada pela ativação das células *naive* (que nunca tiveram contato com antígeno) nos órgãos linfoides secundários (baço e linfonodo), que passam a proliferar e ter funções efetoras determinadas, e uma resposta secundária de células de memória antígeno-especificas. Cada clone de linfócito T maturado no timo expressa um receptor de células T (TCR) distinto na sua superfície. A especificidade antigênica das células T é determinada pelo seu TCR, que reconhece peptídeos antigênicos complexados com moléculas de MHC apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APC) (Figura 21.1).

As funções efetoras dos linfócitos T são citotoxicidade e produção de citocinas. As células T CD8 citotóxicas ativadas são muito eficientes em matar células infectadas ou células malignas via apoptose, através de secreção de granzima e perforina. As células T CD4 auxiliares secretam citocinas com diferentes funções para ajudar outras células do sistema imune. As células T CD4 podem ser subdivididas em células Th1, Th2, Th17, Treg, Th9 e Tfh conforme o perfil de citocinas produzidas. No caso da dicotomia Th1/Th2 as citocinas características Th1 são interferon-gama (IFN-γ) enquanto Th2 são IL-4, IL-5 e IL-13. A resposta Th1, entre outras funções, é importante para auxiliar a resposta das células T CD8, enquanto que a resposta Th2 está envolvida com alergias e resposta a parasitas. As células Th17 produzem IL-17 e IL-22, enquanto as células Th9 produzem IL-9. Já as células Treg, são as células regulatórias e estão envolvidas com tolerância e controle da resposta imune, secretando citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-β. As células Tfh, são as células T foliculares, que ajudam os linfócitos B durante a sua diferenciação.

Existem ferramentas para análise da resposta imune celular. Análise fenotípica de linfócitos por citometria de fluxo é bastante utilizada para diagnóstico de pacientes com imunodeficiência e acompanhamento de pacientes HIV positivos através da contagem das células T CD4. Uma forma de avaliar a imunidade celular é por meio da análise da proliferação de células T após a estimulação com mitógenos ou antígenos específicos. Além disso, pode ser feita a análise da função efetora das células T pela produção de citocinas e ensaios de citotoxicidade, importantes para avaliação de resposta vacinal em testes clínicos. Os ensaios para avaliação da produção de citocinas pelas células T, como exemplo os ensaios de liberação de interferon-gama (IFN-γ) são importantes para diferenciação de tuberculose ativa e tuberculose latente. A imunidade celular também pode ser avaliada por testes cutâneos intradérmicos de hipersensibilidade tardia.

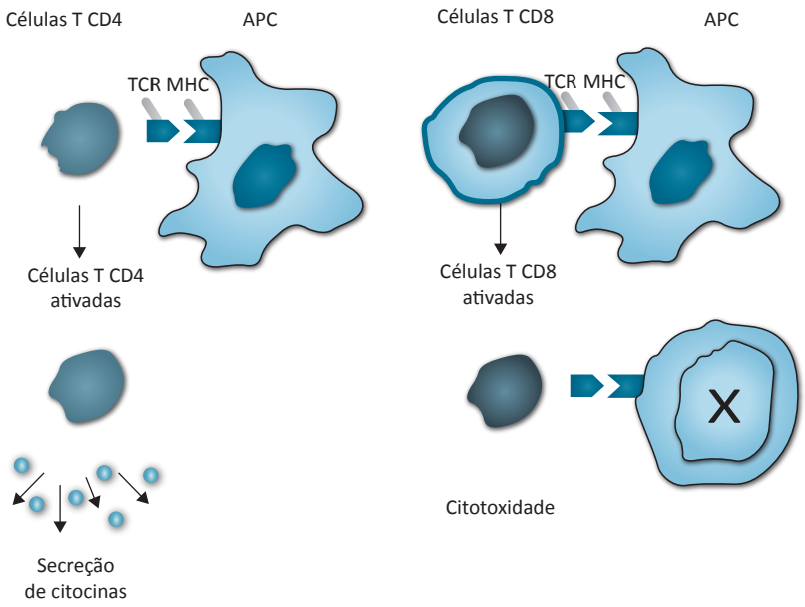


Figura 21.1 Desenho esquemático da ativação das células T. Desenho esquemático da ativação das células T. Painel à esquerda: as células T CD4 *naive* são ativadas após o reconhecimento pelo TCR do complexo MHCII-peptídeo apresentado por uma célula apresentadora de antígeno (APC). A célula T CD4 ativada passa a ter sua função efetora de secreção de citocinas. Painel à direita: as células T CD8 *naive* são ativadas após o reconhecimento pelo TCR do complexo MHCI-peptídeo apresentado pela APC. A célula T CD8 ativada tem função citotóxica contra células infectadas por vírus ou células malignas.

Fonte: Professora Ana Paula Duarte de Souza.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Bonelli M, Shih HY, Hirahara K, et al. Helper T cell plasticity: Impact on extrinsic and intrinsic signal on transcriptomes e epigenomes. Curr Top Microbiol Immunol. 2014;381:279-326.
2. Broere F, Apasov SG, Sitkovsky M, et al. T cells subsets and T cell-mediated immunity. In: Nijkamp FP, Parnham MJ. Principles of immunopharmacology. New York: Springer, 2011.
3. Murphy K. Imunobiologia de Janeway. 8.ed. São Paulo: Artmed, 2014.
4. Rohr JC, Gerlach C, Kok L, et al. Single cell behavior in T cell differentiation. Trends Immunol. 2014;35(4):170-7.
5. Vaz A. Imunoensaios Fundamentos e Aplicações. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2013.

22

capítulo

Ana Lígia Bender ▪ Ana Paula Duarte de Souza ▪ Fernando Thomé Kreutz

Imunidade Humoral

INTRODUÇÃO

A imunidade humoral refere-se à resposta imune mediada por anticorpos. Anticorpos são proteínas produzidas pelas células B ativadas (plasmócitos), que protegem o hospedeiro contra infecções de três maneiras: ligando-se ao patógeno e inibindo seu efeito tóxico ou infectividade (neutralização), recobrindo patógeno e facilitando a fagocitose (opsonização) ou ativando a cascata do complemento que culmina com a lise do patógeno.

A molécula de anticorpo é composta por duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) ligadas por pontes de dissulfeto. A porção amino-terminal do anticorpo é chamada de fragmento de ligação ao antígeno (Fab). A porção carboxiterminal, conhecida como fração cristalizável (Fc), tem funções especificas ligando-se ao seu respectivo receptor nas células do sistema imune e às proteínas da cascata do complemento. A molécula do anticorpo possui uma região variável (V), que confere sua especificidade a diferentes antígenos e uma região constante (C) (Figura 22.1).

Existem cinco classes de imunoglobulinas, também chamadas de isotipos. São elas: IgM, IgG, IgE, IgA e IgD (Tabela 22.1). Em sua forma monomérica, todas as classes possuem a estrutura básica dos anticorpos. A IgM e IgA são classes que possuem pentâmeros e dímeros, respectivamente, que para sua formação é necessária a cadeia J. Análises sorológicas demonstraram heterogeneidade entre imunoglobulinas da mesma classe, então foram propostas subclasses. Existem quatro subclasses de IgG (IgG1 a IgG4) e duas subclasses de IgA (IgA1 e IgA2).

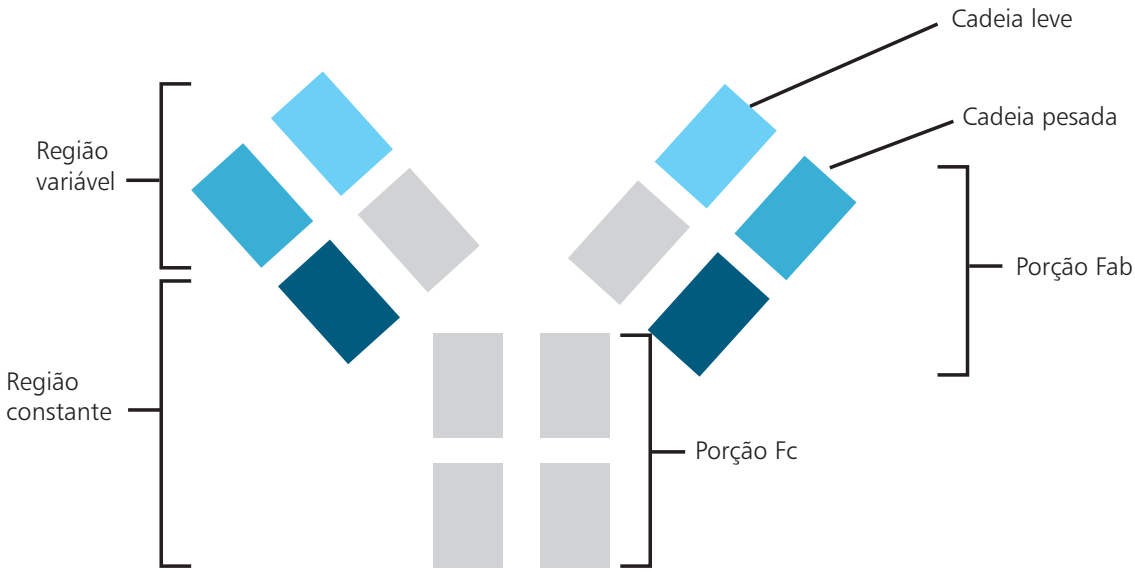


Figura 22.1 Desenho esquemático da estrutura do anticorpo.
Fonte: Professora Ana Paula Duarte de Souza.

Tabela 22.1 Características das cinco classes de imunoglobulinas.

Imunoglobulina	Características
IgM	É a primeira classe de imunoglobulinas produzida pelos linfócitos B. Em sua forma ligada à membrana atua como um receptor de linfócito B (BCR). Ativa a via clássica do complemento
IgG	Mais abundante na circulação sanguínea Capaz de atravessar a placenta É o anticorpo principal nas respostas imunes secundárias Ativa a via clássica do complemento (IgG3)
IgE	Envolvida em reações imunes contra helmintos e nas alergias Grande afinidade para receptores nas membranas de mastócitos e basófilos
IgA	Envolvida na imunidade em mucosas na forma dimérica, sendo secretada no leite materno, lágrima, na saliva e nas secreções nasal, bronquial, da próstata e da vagina Apresenta baixa concentração no sangue na forma monomérica
IgD	É encontrada na superfície de linfócitos B como a IgM Sua função biológica não é muito bem-estabelecida

Após o reconhecimento do antígeno pelo seu receptor (BCR), a célula B *naive* pode se tornar um plasmócito de vida curta, um plasmócito de vida longa, ou uma célula B de memória. As células B de memória e os plasmócitos de vida longa dão origem à memória sorológica. A diferenciação dessas células depende da ajuda da célula T CD4 específica para o antígeno cognato da célula B. Além disso, a células T CD4 controlam a troca de isotipo e têm função no início da hipermutação somática dos genes da região variável do anticorpo, processo que confere mais afinidade ao mesmo.

A detecção de anticorpos específicos contra patógenos no soro dos pacientes tornou-se fundamental para o diagnóstico de doenças infecciosas. A quantificação de imunoglobulinas totais e de seus isotipos é utilizada para diagnóstico de imunodeficiências. Os anticorpos também são ferramentas importantes presentes nos imunoensaios.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Elgheta R, de Vries V, Randolph JN. The immortality of humoral immunity. Immunol Rev. 2010;236:139-50.
2. Murphy K. Imunobiologia de Janeway. 8.ed. São Paulo: Artmed, 2014.
3. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. Front Immunol. 2014;5:520.

Ana Lígia Bender ▪ Ana Paula Duarte de Souza ▪ Fernando Thomé Kreutz

Hipersensibilidade

INTRODUÇÃO

As reações de hipersensibilidade foram descritas primeiramente por Coombs e Gell, em 1963. São respostas imunológicas excessivas, que causam dano ao organismo, podendo levar o paciente à morte. Existem quatro tipos principais de reações de hipersensibilidade classificados conforme seu mecanismo de resposta.

Hipersensibilidade do tipo I

Esse tipo de reação acontece em indivíduos previamente sensibilizados pelo alérgeno. Exemplos de hipersensibilidade do tipo I são: asma, rinite alérgica, alergia a alimentos. Na primeira exposição as APC captam o alérgeno, processam e apresentam para as células T CD4. Em um indivíduo suscetível ocorre uma resposta Th2, que secreta citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. Essas citocinas induzem a proliferação das células B, que produzem IgE e recrutam eosinófilos. A IgE irá ligar-se aos receptores da porção FcE presentes nos mastócitos. Na segunda exposição ao alérgeno, este pode ligar-se nas IgE previamente ligadas aos mastócitos de forma cruzada, estimulando desta forma a degranulação dos mesmos. Os mastócitos liberam mediadores, como a histamina, que são responsáveis pelos sintomas da alergia.

Existem diversos sintomas da alergia. Variam de coceira, falta de ar, tosse, espirros, rinorreia, diarreia, vômitos. Em algumas situações a reação pode ser tão severa que leva a inchaço da traqueia, e a uma condição chamada anafilaxia, que pode causar a morte se não tratada. As causas mais comuns de anafilaxia são alergia a alimentos, picadas de insetos e medicamentos. O tratamento envolve, primeiramente, eliminar os sintomas clínicos da reação alérgica, e na sequência estratégias que diminuam a resposta imune inicial ao alérgeno. Para minimizar o contato com o alérgeno, este deve ser identificado, e, para isso, pode ser feita a medida de IgE específica no plasma ou teste cutâneo com os alérgenos potenciais.

Hipersensibilidade do tipo II

Esse tipo de reação causa dano tecidual através da ligação de anticorpo ao antígeno não solúvel (célula ou elemento da matriz extracelular) sem envolvimento direto de linfócitos, ocorrendo a destruição do alvo. Exemplos de hipersensibilidade do tipo II são: reações transfusionais hemolíticas agudas; incompatibilidade Rh; síndrome de Goodpasture; algumas alergias a fármacos; miastenia grave; e urticária crônica.

O passo inicial para a reação de hipersensibilidade do tipo II é a ligação do anticorpo ao antígeno. Esses anticorpos são pré-formados, ou seja, já estão presentes quando a reação de hipersensibilidade ocorre. Os anticorpos podem funcionar como opsonina, levando à fagocitose da célula-alvo por macrófagos ou neutrófilos. Além disso, os anticorpos podem iniciar uma resposta citotóxica dependente de anticorpo (ADCC) onde atuam células NK, macrófagos e monócitos ativados.

Hipersensibilidade do tipo III

Esse tipo de reação ocorre devido a uma produção exacerbada de imunoglobulinas IgG e IgM para um antígeno solúvel que pode levar à formação excessiva de imunocomplexos. Exemplos de hipersensibilidade do tipo III são: efeitos adversos de imunizações; reação de Arthus; doença do soro; e doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico. A grande quantidade de imunocomplexos pode levar à ativação de via clássica do complemento, e produção de mediadores inflamatórios que ativam fagócitos culminando com dano tecidual. Os imunocomplexos podem acumular nos linfonodos, nos rins e nas articulações.

Hipersensibilidade do tipo IV

Essa reação, também conhecida como hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), foi originalmente caracterizada pelo seu tempo de 12 a 24h para se desenvolver, e persiste por dois ou três dias. Os melhores exemplos da hipersensibilidade do tipo IV são a reação induzida pela injeção de tuberculina na pele (reação de Mantoux), a exposição ao hapteno dinitrofluorbenzeno (DNFB), e a dermatite de contato. A DTH é diretamente dependente das células T CD4, que reconhecem o antígeno pelas APC, se diferenciando em células Th1 e produzem IFN-γ e fator de necrose tumoral α (TNF-α). Essas citocinas atuam sobre monócitos e células epiteliais para induzir mais TNF-α e outras citocinas proinflamatórias como IL-1 e IL-6, que induzem a produção de quimiocinas. Consequentemente, ocorre o recrutamento de mais células T e macrófagos para a lesão.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Black CA. Delayed type hypersensitivity: current theories with a historic perspective. Dermatol Online J. 1999 May 5(1):7.
2. Gell PGH, Coombs RRA. Clinical Aspects of Immunology. 1.ed. Oxford: Blackwell, 1963.
3. Sicherer SH, Leung DY. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2014. J Allergy Clin Immunol. 2015 Feb; 135(2):357-67.

Ana Lígia Bender ▪ Ana Paula Duarte de Souza ▪ Fernando Thomé Kreutz

Reações Imunológicas

INTRODUÇÃO

Os testes diagnósticos laboratoriais são ferramenta valiosa para o clínico. São muitos os parâmetros laboratoriais analisados através de imunoensaios.

Imunoensaios são métodos bioanalíticos, em que a identificação ou a quantificação do analito depende da reação de um antígeno com um anticorpo (Darwish IA, 2006). São utilizados para a detecção ou quantificação de antígenos ou anticorpos (Figura 24.1), podendo utilizar reagentes marcados ou não marcados. Os ensaios com reagentes não marcados possuem sensibilidade de detecção menor, pois é necessário que se forme grande quantidade de imunocomplexos para que se processe a visualização do fenômeno. A utilização de sistemas de marcação de reagentes (com enzima, fluorocromo, radioisótopo ou substância quimioluminescente) torna possível a amplificação do sinal final e detecção por meio de instrumentos (fotometria, fluorimetria ou luminometria), elevando a sensibilidade dos imunoensaios à ordem de atomol ou zeptomol ($10^{-19}/10^{-21}$). (Bender AL, e von-Mühlen CA, 2007).

$$[Ag] + [Ac] \underset{Kd}{\overset{Ka}{\rightleftharpoons}} [AgAc]$$

[Ag] = concentração de antígeno
[Ac] = concentração de anticorpo
[AgAc] = complexo antígeno-anticorpo
Ka = constante de associação
Kd = constante de dissociação
* Antígeno ou anticorpo podem ser marcados

Figura 24.1 Reação antígeno-anticorpo.
Fonte: Bender AL; *et al.*, 2007.

Para os imunoensaios **heterogêneos** (Figura 24.2) é necessária a separação do reagente marcado livre daquele ligado, enquanto para os **homogêneos** (Figura 24.3) não é necessária a separação. Nos heterogêneos o reagente imunoquímico (antígeno ou anticorpo) é fixado a uma fase sólida (micropartícula, microplaca, tubo, esfera, nitrocelulose, látex, gelatina etc.) e a separação é realizada normalmente por processos de lavagem. Nos homogêneos é avaliada alteração do sistema quando ocorre a ligação antígeno e anticorpo, e não são necessários procedimentos de lavagem.

A qualidade e pureza dos reagentes imunoquímicos é fundamental para o desempenho do imunoensaio. Houve grande desenvolvimento na tecnologia de produção de anticorpos e antígenos, bem como dos analisadores automatizados. Esses avanços tecnológicos agregaram baixa variabilidade inter e intraensaio, e rapidez na realização dos testes. Apesar do aumento nos processos automatizados nos laboratórios clínicos, a intervenção humana é requerida em várias fases do processo analítico e pós-analítico, principalmente no que se refere à validação dos resultados. O processo de validação é chave na prevenção de erros (imprecisão, inexatidão), e interpretação dos resultados. (Bender AL, e von-Mühlen CA, 2007)

Os tipos de imunoensaios heterogêneos segundo Davis C, 2005, são:

a) Imunométrico.
b) Competitivo.
c) Captura (método direto e método indireto).

Os tipos de imunoensaios heterogêneos,

Interferentes em imunoensaios

Os mecanismos de interação molecular conferem boa especificidade aos imunoensaios, contudo, a monoespecificidade entre um antígeno e um anticorpo não é absoluta. A ligação molecular ocorre em um modelo espacial tridimensional, que envolve alguns domínios variáveis nas cadeias leve e pesada, em cada braço da molécula de anticorpo. O epítopo antigênico e seu contato ao parátopo do anticorpo determina o número de ligações não covalente formadas. Assim, a *reatividade cruzada* é uma propriedade intrínseca pela qual os anticorpos ligam-se a diferentes antígenos, amplificando sua diversidade funcional (Ismail AAA, 2009). A especificidade dos imunoensaios não é absoluta.

O tempo, a temperatura e o pH influenciam a complexidade conformacional do antígeno/anticorpo e, consequentemente, a reação e a imobilização à fase sólida (característica comum em quase todos os imunoensaios automatizados). Outros aspectos fundamentais são: volume, viscosidade e

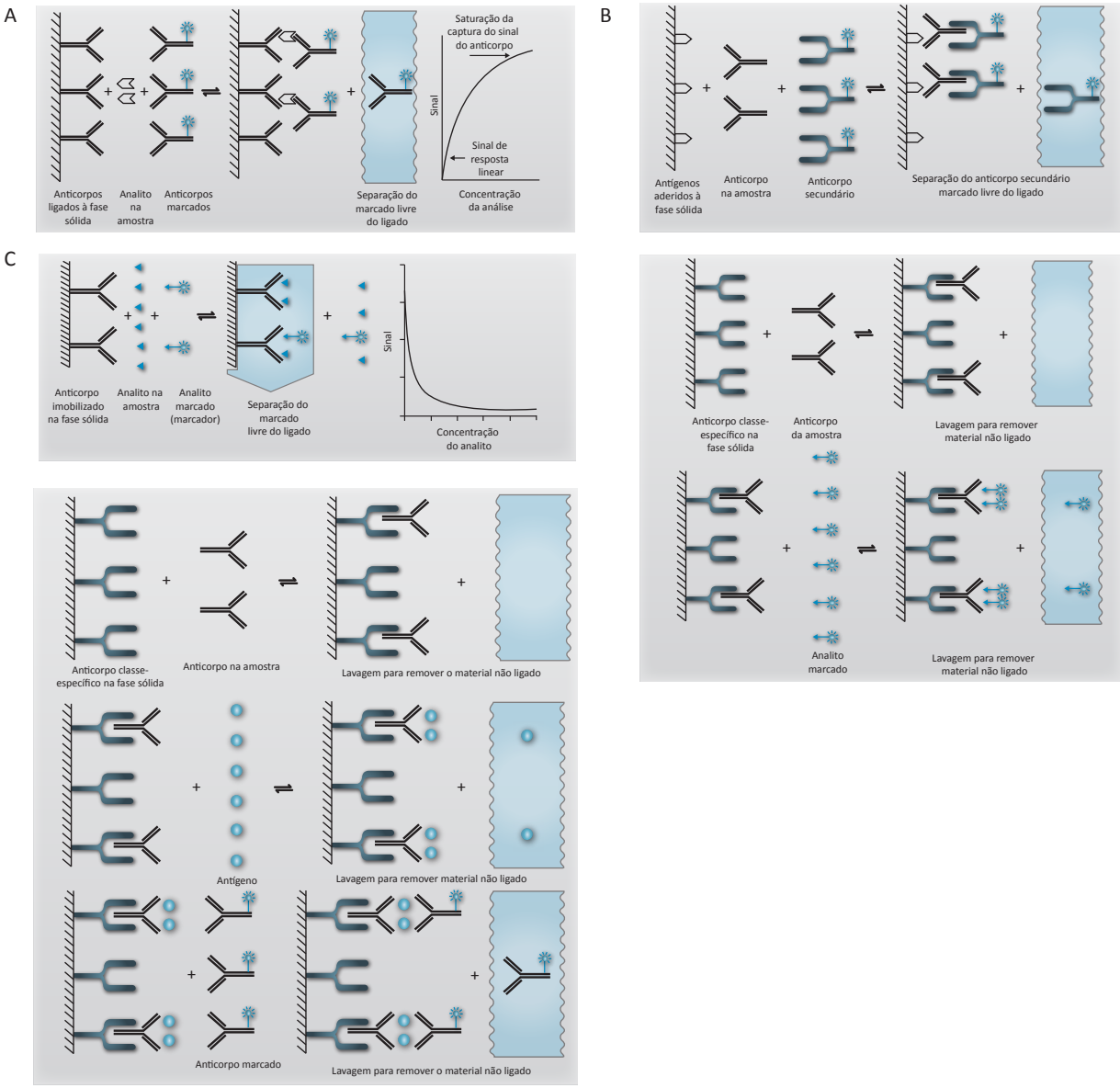


Figura 24.2 Tipos de imunoensaios. **(A)** Imunoensaio competitivo (separação na fase sólida); **(B)** Imunoensaio de captura (método direto); **(C)** Imunoensaio de captura (método indireto).
Fonte: Adaptada de Davis, 2005.

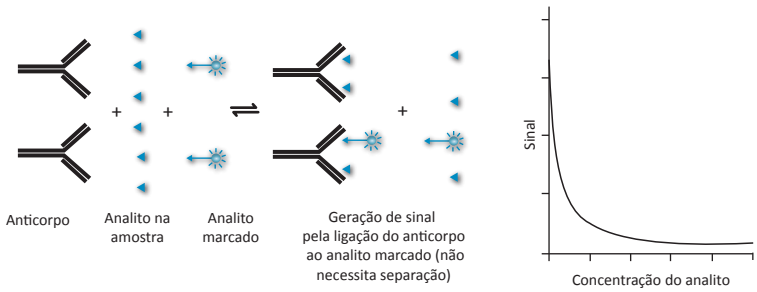


Figura 24.3 Exemplo de imunoensaio homogêneo.
Fonte: Davis, 2005.

ordem de adição dos reagentes (simultânea ou sequencialmente), e devem ser realizadas estritamente nas condições de padronização do fabricante. Além disso, os antígenos precisam chocar-se com o anticorpo reagente de captura, quando eles se ligam espontaneamente, contudo, as moléculas maiores podem exigir uma orientação particular antes da ligação (Ismail AAA, 2009).

Alguns tipos de interferentes nos imunoensaios são similares aos interferentes em outros ensaios químicos, no entanto, outros são únicos dos imunoensaios (Tabela 24.1) e incluem:

a) **Reatividade Cruzada:** uma substância na amostra com estrutura similar ao analito compete pela ligação com o anticorpo. Reatividade cruzada é o interferente mais comum nos imunoensaios. O efeito da reatividade cruzada na curva dose-resposta é testado no desenvolvimento do imunoensaio pelo fabricante (Ismail AAA 2009).

b) **Efeito Hook:** (ou "efeito gancho") é um estado de excesso de antígeno em que concentrações muito altas do analito saturam todos os sítios de ligação dos anticorpos reagentes sem formação de complexos. Os resultados serão falsamente baixos. Esse efeito é relatado para muitos analitos, principalmente em análises turbidimétricas, nefelométricas e imunométricas "one step". O efeito hook é reduzido com a introdução de uma etapa de lavagem entre a incubação da amostra e do anticorpo de detecção (Miller JJ, 2004).

c) **Interferência de Anticorpos:** a interferência de anticorpos endógenos em imunoensaios é um grande problema sem solução analítica, e é subestimado, o que tem consequências clínicas e ocorre pela ligação desses com os anticorpos reagentes. Há dois tipos principais de anticorpos endógenos que interferem nos ensaios imunométricos: anticorpos antianimal e anticorpos heterófilos. Ambos interferem nos imunoensaios imunométricos por meio da ligação entre o anticorpo de captura e o anticorpo de ligação, mesmo na ausência do analito, levando a resultados falsamente elevados. A interferência negativa é possível, também, quando o anticorpo interferente liga-se somente a um dos anticorpos reagentes. O anticorpo antianimal mais conhecido é o anticorpo humano anticamundongo (human anti-mouse antibodies – anti-HAMA). É importante que os reagentes dos imunoensaios imunométricos incluam soro ou agentes bloqueadores para minimizar a interferência de anticorpos antianimal e heterófilos (Miller JJ, 2004).

d) **Efeito Matriz:** a matriz de amostra é o ambiente da substância a analisar e inclui pH, força iônica, e as concentrações de proteína e lípidios da amostra. Os efeitos da matriz são causados por variações na reatividade da substância a analisar devido a variações no seu ambiente na amostra. Os imunoensaios são muitas vezes sensíveis à matriz devido aos efeitos sobre o antígeno e à ligação do anticorpo, à eficiência de separação das frações ligadas e não ligadas, e à extensão da ligação não específica (Miller JJ, 2004).

Tabela 24.1 Tipos de interferência nos imunoensaios.

Tipo de interferência	Tipo de ensaio afetado
Reatividade cruzada	Todos, principalmente os imunoensaios competitivos
Efeito *Hook*	Ensaios nefelométricos, turbidimétricos e imunométricos
Interferência de anticorpos	Todos, principalmente imunométricos
Efeito matriz	Todos
Interferência de sinal*	Todos os imunoensaios marcados

* Algumas amostras podem conter compostos que aumentam ou diminuem artificialmente a magnitude do mecanismo de detecção, por exemplo, a fluorescência. Isso é chamado de interferência de sinal, pois existem muitos tipos de mecanismos de marcação utilizados nos imunoensaios, e muitos subtipos de interferência de sinal.

Fonte: Miller JJ, 2004.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Bender AL, von-Mühlen CA. Testes Laboratoriais Aplicados à Imunologia Clínica. Imunologia Médica (Julio Voltarelli Org.). Rio de Janeiro: Atheneu, 2007.
2. DarwishI A. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. Int J Biomed Sci. 2006 September;2(3):217-35.
3. Davis C. Introduction to Immunoassay Principles. The Immunoassay Handbook (David Wild Ed.) Oxford: Elsevier, 2005.
4. Ismail AAA. Interference form endogenous antibodies in automated immunoassays: what laboratorians need to know. J Clin Pathol. 2009;62:673-8.
5. Miller JJ. Interference in immunoassays: avoiding erroneous results. Clin Lab Int. 2004;28:14-7.

25

capítulo

Ana Lígia Bender ▪ Ana Paula Duarte de Souza ▪ Fernando Thomé Kreutz

Imunodeficiências

INTRODUÇÃO

As imunodeficiências primárias consistem de um grupo de mais de cem doenças hereditárias, principalmente monogênicas, predispondo os indivíduos a diferentes quadros de infecções, alergias, autoimunidade e câncer. Representam modelos imunopatológicos complexos, com a identificação de mais de cem genes associados (exemplos na Tabela 25.1), trazendo muitas informações sobre o sistema imunológico e os aspectos do desenvolvimento, função e regulação da imunidade inata e adaptativa (Fischer A, 2004).

As imunodeficiências primárias de anticorpos (Figura 25.1) são as imunodeficiências humanas mais comuns. No passado eram atribuídas a defeitos intrínsecos das células B. No entanto, sabe-se que podem ser causadas por deficiências funcionais em outras linhagens de células (incluindo elementos da imunidade inata e células T). A abordagem molecular do estudo das imunodeficiências primárias forneceu importantes elementos também à gênese da autoimunidade e do controle da reatividade das células. A caracterização genética é essencial para o diagnóstico das imunodeficiências e subsequente tratamento dos portadores.

Tabela 25.1 Algumas causas genéticas das imunodeficiências primárias.

Doença	Gene
Imunidade inata	
Neutropenia congênita grave (subtipos)	GFI1[a]
Síndrome Shwachman	SBDS[a]
Suscetibilidade ao *Streptococcus pneumoniae* (subtipos)	MSP2
Suscetibilidade às infecções bacterianas piogênicas (subtipos)	IRAK4
Suscetibilidade a infecções por micobactérias e vírus	STAT1
Imunidade adaptativa	
Imunodeficiência comum variável	ICOS
Síndrome Hiper IgM (HIGN)	UNG
Imunodeficiência combinada severa (SCID)	CD3D
Deficiência de células T sem resposta ao IFN-γ	STAT5B
Deficiência de células T com displasia ectodérmica anidrótica	NFKBIA
Linfo-histiocitose hemofagocítica familiar (subtipos)	UNC13D
Indeterminada	
Edpidermodisplasia verruciforme	EVER1, EVER2
Síndrome WHIM	CXCR4

Fonte: Adaptada de Fischer, 2004.

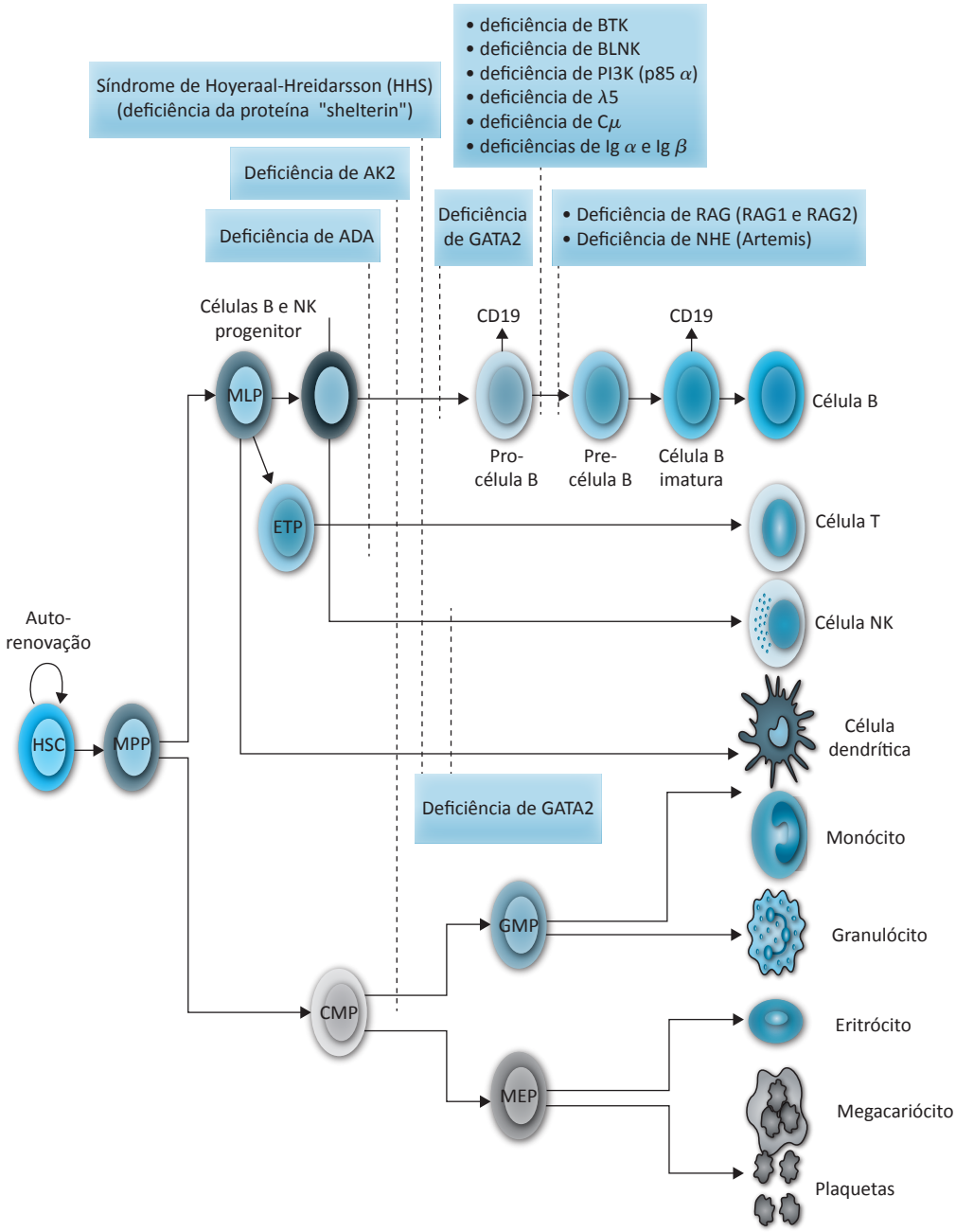


Figura 25.1 Defeitos no desenvolvimento nas células B, que levam à deficiência primária de anticorpos. As linhas tracejadas indicam um bloco de diferenciação. BLNK, B ligante celular; BTK, tirosina quinase de Bruton; CMP, precursor mieloide comum; ETP, precursor de células T precoce; GMP, precursor de granulócitos/macrófagos; MEP, precursor de megacariócitos/eritrócitos; MLP, progenitor multilinfoide; MPP, progenitor multipotente; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase.
Fonte: Durandy, *et al.*, 2009.

No ano de 2014 a União Internacional das Sociedades de Imunologia (*International Union of Immunological Societies – IUIS*) publicou a classificação atualizada das imunodeficiências primárias, elaborada pela comissão de especialistas, com a inclusão de defeitos adquiridos (fenocópias das imunodeficiências primárias). Para cada doença estão disponíveis as características clínicas e laboratoriais fundamentais. É a referência atual do conhecimento em imunodeficiências primárias e, dada sua extensão e complexidade, não serão aqui reproduzidas. Encontra-se disponível em http://primaryimmune.org/wp-content/uploads/2014/05/IUIS-Classification-April-2014.pdf. (Al-Herz W, *et al.*, 2014.)

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. Front Immunol. 2014;5(162):1-33.
2. Durandy A, Kracker S, Fischer A. Primary antibody deficiencies. Nat Rev Immunol. 2013;13(7):519-33.
3. Fischer A. Human primary immunodeficiency diseases: a perspective. Nat Immunol. 2004;5(1):23-30.

26

capítulo

Ana Lígia Bender ▪ Ana Paula Duarte de Souza ▪ Fernando Thomé Kreutz

Autoimunidade

INTRODUÇÃO

A autoimunidade envolve a perda da homeostase imune normal, onde o organismo produz uma resposta anormal aos seus próprios tecidos. As doenças autoimunes são um grupo de doenças heterogêneas caracterizadas por reações celulares e humorais contra antígenos próprios, causando inflamação e danos aos tecidos e órgãos (Plebami M, *et al.*, 2009). São muitas as doenças e muitos os parâmetros laboratoriais. O laboratório clínico é fundamental no estabelecimento do diagnóstico, do prognóstico e no monitoramento das doenças autoimunes. Muitos testes laboratoriais são necessários, como hemograma completo, painel de avaliação metabólica, medida de proteínas de fase aguda, entre tantos. Alguns testes, mesmo inespecíficos, como a velocidade de sedimentação globular (VSG), são úteis na avaliação da atividade da doença autoimune (Tabela 26.1) (Castro CC, e Gourley M, 2009).

Entre as importantes ferramentas que o laboratório clínico oferece à equipe de saúde para diagnóstico e monitoramento das doenças autoimunes está a pesquisa de autoanticorpos, empregando amplo espectro de métodos e técnicas, principalmente imunoensaios. Em relação à autoimunidade, os laboratórios vivem uma situação dinâmica de crescimento e constante aumento em novos testes disponíveis, principalmente para detecção de novos autoanticorpos (González-Buitrago JM, & González C, 2006).

A produção de autoanticorpos específicos de alta afinidade representa a marca registrada das reações autoimunes, e um ou mais parâmetros laboratoriais constituem critério para o diagnóstico e/ou classificação da doença autoimune (DAI) (Tozzoli R, e Bizarro N,2012).

Novos autoanticorpos são descritos em doenças que são posteriormente consideradas doenças autoimunes. O horizonte dos autoanticorpos ampliou o conhecimento e sua relevância na etiopatologia de doenças, tais como: esclerose sistêmica, miosite, síndrome do anticorpo antifosfolípide e *miastenia gravis*, entre outras. Os autoanticorpos também podem levar à identificação de subfenótipos de doenças autoimunes. O valor do autoanticorpo não é limitado ao diagnóstico, mas estende-se à predição, ao prognóstico e à prevenção das doenças autoimu-

Tabela 26.1 Marcadores de atividade inflamatória úteis nas doenças autoimunes.

Marcador	Comentário
VSG	Boa correlação com a atividade da doença na AR.
Proteína C-Reativa Ultrassensível (CRPus)	A magnitude da inflamação se relaciona diretamente à concentração de CRP.
Ferritina	Níveis aumentados podem indicar sépsis aguda ou crônica, inflamação ou neoplasia.
Ceruloplasmina	Sua concentração está aumentada em pacientes com estados inflamatórios agudos e crônicos, gravidez, linfoma, artrite reumatoide e doença de Alzheimer.
Fibrinogênio	É um fator hemostático da coagulação. Aumenta na presença de inflamação ou estresse mediado por IL-6.
Haptoglobina	É produzida em resposta à injúria tecidual. Níveis aumentados em estados inflamatórios, cirurgias, trauma, úlcera péptica, colite ulcerativa.
Albumina	A taxa de síntese de albumina pode duplicar em situações de perda rápida de albumina, como na glomerulonefrite ou doença inflamatória intestinal, e os níveis séricos diminuirão.

Fonte: Castro CC, e Gourley, 2009.

nes. Não é apenas o número de autoanticorpos diferentes que está cada vez maior, mas também as metodologias laboratoriais para sua detecção, com automatização e análise multiplex (Damoiseaux J, *et al.*, 2015; Tozzoli R, e Bizarro N, 2012). A Tabela 26.2 mostra as principais metologias utilizadas no laboratório clínico na investigação de doença autoimune.

O teste de detecção de anticorpos anticelulares em células HEp-2 por imunofluorescência indireta (ANA/FAN

Tabela 26.2 Recomendações para detecção de autoanticorpos contra componentes celulares (ANAs/FAN).

1	O diagnóstico de doenças autoimunes reumáticas sistêmicas requer um painel de testes laboratoriais específicos (ANA/FAN HEp-2, anti-dsDNA, anti-ENA, etc).
2	A detecção de ANAs é o teste de primeiro nível a ser realizado no laboratório para o diagnóstico de doenças autoimunes reumáticas sistêmicas.
3	O propósito principal da testagem de ANAs é diagnóstico e não monitoramento da progressão da doença.
4	A imunofluorescência indireta é o método de referência para pesquisa de ANAs (triagem).
5	Os laboratórios devem especificar os métodos utilizados para a detecção de ANAs nos resultados (laudos).
6	Os testes baseados em uma mistura limitada de antígenos nucleares definidos não devem referir-se aos mesmos como "ANA Teste" ou "ANA *screening*".
7	Os laboratórios que utilizam testes "*in house*" para detecção de ANAs (bem como anti-dsDNA) e anticorpos anti-ENA específicos devem padronizar cada teste de acordo com os padrões internacionais (p. ex.: OMS, CDC/IUIS).
8	Para triagem de ANAs por imunofluorescência indireta o anticorpo secundário conjugado deve ser anti-IgG humana, marcada com fluorocromo.
9	Um ANA adequado depende dos reagentes, de equipamentos e de outros fatores locais, assim, a diluição de triagem deve ser definida localmente. Um ANA anormal deve ser o título acima do percentil 95 de uma população-controle saudável. Em geral, uma diluição de triagem de 1/160 em substrato HEp-2(000) convencional é adequada para detecção de ANA em uma população adulta avaliada para doenças autoimunes reumáticas sistêmicas.
10	Em caso de teste ANA positivo é recomendado que o padrão e maior diluição que demonstrem reatividade seja relatada no laudo do exame.
11	Os padrões de ANA devem ser relatados de acordo com a nomenclatura padronizada (consensos).
12	Além de padrões nucleares, também os padrões citoplasmáticos e aparelhos mitóticos devem ser relatados e especificados quando possível.
13	Em casos de suspeita de LES com resultado de ANA positivo é aconselhada a testagem para anticorpos anti-dsDNA
14	O método utilizado para pesquisa de anticorpos anti-dsDNA deve ser referido no laudo (maior especificidade para o ensaio de Farr e o CLIFT).
15	A pesquisa de anticorpos anti-dsDNA deve ser quantitativa ou semiquantitativa
16	No monitoramento da atividade da doença no LES, através da determinação quantitativa dos anticorpos anti-dsDNA, o mesmo método deve ser utilizado.
17	No caso de ANA teste positivo em uma investigação diagnóstica (dependendo do padrão) deve ser realizada a pesquisa de anticorpos anti-ENA. Em caso de discrepância entre o resultado anti-ENA e ANA por imunofluorescência indireta deve ser realizada a pesquisa através de um método adicional.
18	Determinação quantitativa de anticorpos anti-RNP é recomendada em caso de suspeita de Doença Mista do Tecido Conjuntivo.
19	Cada laboratório deve verificar o *cut-off* recomendado pelos *kits* utilizados para determinação dos ANAs. É recomendado pareamento de idade e gênero nas amostras de indivíduos saudáveis da população local.
20	Cada laboratório deve verificar o *cut-off* recomendado pelos *kits* utilizados para pesquisa de anticorpos anti-dsDNA e anti-ENA. É recomendado o uso de um número adequado de amostras de pacientes com doenças autoimunes, controle e indivíduos saudáveis e o *cut-off* definido utilizando análise da curva ROC.

ANA = *antinuclear antibodies* (anticorpos antinucleares); FAN = fator antinuclear; dsDNA = *double-stranded DNA* (DNA dupla hélice); ENA = *extratable nuclear antigen* (antígeno nuclear extraível); LES = Lúpus eritematoso sistêmico.

Fonte: Adaptada de Agmon-Levin *et al.*, 2014.

Hep-2) é o mais solicitado ao laboratório clínico e mantém sua importância no diagnóstico de doenças reumáticas autoimunes sistêmicas (Damoiseaux J, *et al.*, 2015).

Tem aumentado o interesse nos autoanticorpos na detecção pré-clínica das doenças autoimunes. Particularmente em relação aos autoanticorpos pesquisados em células HEp-2, podem estar presentes dez anos antes do início dos sintomas clínicos. A prevalência dos ANAs em títulos baixos chega a 25%. A presença de autoanticorpos não é patológica *per se*. Sabe-se que a autorreatividade é um achado importante na resposta imune normal, e estuda-se quais fatores seriam o gatilho para a progressão da doença AI (Figura 26.1) (Olsen NJ, e Karp DR, 2014). As Tabelas 26.2 e 26.3 apresentam a síntese das recomendações internacionais para avaliação de autoanticorpos contra antígenos celulares (conhecidos em nosso meio como ANAs/FAN). As informações referentes ao IV Concenso Brasileiro para Pesquisa de Autoanticorpos em Hep-2 estão disponíveis em http://www2.ucg.br/cbb/sites/ivconsensohep2/index.php. Face a sua extensão e atualização periódica, não serão apresentadas nesse capítulo.

ANA/FANs HEp2 sem doença

- 25% dos indivíduos saudáveis apresentam ANA positivo ≥ 1/40 (RIFI);
- 5% dos indivíduos saudáveis apresentam ANA positivo ≥ 1/160 padrão nuclear pontilhado;
- 2% dos indivíduos saudáveis apresentam ANA positivo em níveis considerados patológicos.
- Padrão mais frequente: nuclear pontilhado fino denso (antígeno PSIP1 70kDa) está presente em 9% dos indi-

Tabela 26.3 Classificação dos imunoensaios utilizados para investigação de doenças autoimunes.

Imunoensaios de primeira geração ("monoplex")
Imunodifusão Radial Dupla (IDRD)
Reação de Fixação do Complemento (RFC)
Imunofluorescência Indireta (RIFI)
Aglutinação Passiva (AP)
Radioimunoprecipitação (RIPA)
Western Blot (WB)
Imunoensaios de segunda e terceira geração ("monoplex")
Radioimunoensaio (RIA)
Ensaio Imunorradiométrico (IRMA)
Enzimaimunoensaio (EIE)
Imunoblot (IB)
Imunodot (DB)
Ensaio de Quimioluminescência (CLIA)
Fluorimunoensaio (FIA)
Imunoensaios multiplex
Addressed microbead (MBA)
Line immunoassay (LIA)

Fonte: Adaptada de Tozzoli e Bizarro, 2012.

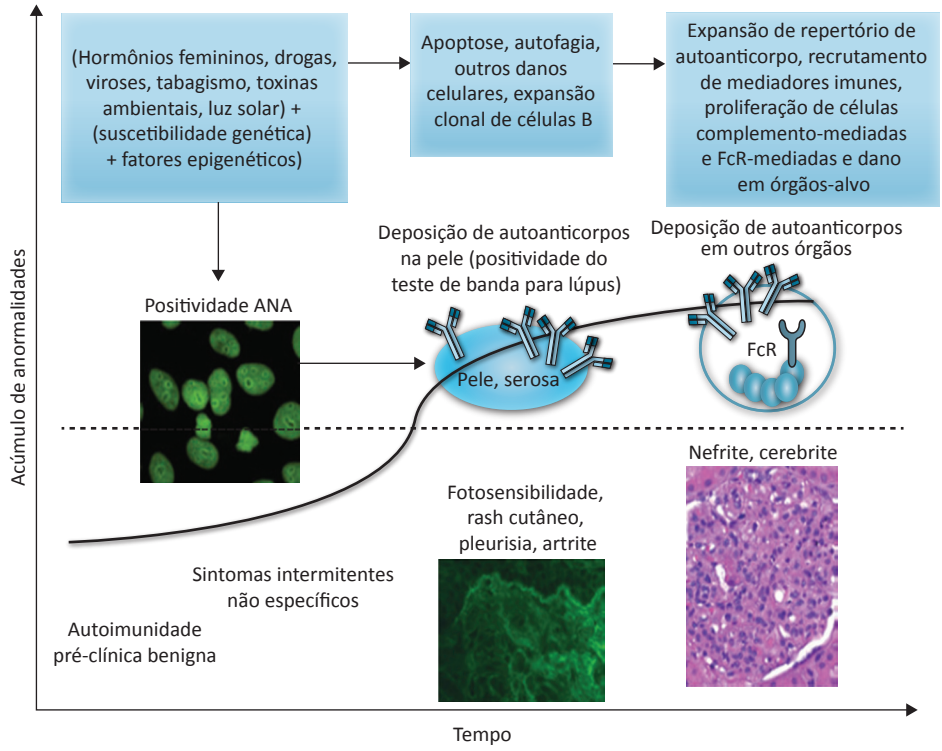


Figura 26.1 Progressão da autoimunidade benigna pré-clínica até o LES, proposto por Olsen NJ, e Karp, 2014.

víduos saudáveis, e em menos de 3% dos pacientes com LES. O segundo grupo com esse padrão mais prevalente são os portadores de tireoidite de Hashimoto. Alguns autoanticorpos detectados têm sido associados a doenças AI órgão-específicas (Olsen NJ, e Karp DR, 2014).

Autoanticorpos e progressão da autorreatividade

- Em relação ao LES, os anticorpos anti-SSa e anti-SSb parecem surgir antes do início dos sintomas.
- Em alguns pacientes os anticorpos anti-dsDNA aparecem, em média, três a quatro anos antes do diagnóstico de LES (Olsen NJ, e Karp DR, 2014).

O diagnóstico laboratorial das doenças autoimunes é extremamente complexo, com novas metodologias e autoanticorpos descritos. Além disso, o conhecimento do potencial dos autoanticorpos como preditores, marcadores prognósticos e na prevenção de doenças autoimunes é crescente, e apresentam vários desafios, exigindo uma comunicação estreita entre o clínico e o profissional de laboratório (Damoiseaux J, *et al.*, 2015).

A Tabela 26.4 apresenta os principais padrões de anticorpos anticelulares observados em células HEp2 por reação de imunofluorescência indireta, antígenos reconhecidos e associação diagnóstica.

Tabela 26.4 Padrões nucleares/citoplasmáticos ANA/FAN HEp-2 (RIFI) e antígenos/diagnóstico.

Padrões mais reconhecidos		
Padrões nucleares	**Antígenos relacionados**	**Diagnósticos relacionados**
Homogêneo	**dsDNA, histonas, cromatina/ nucleossomas,** HMG	LES, LES droga induzido/vasculites, artrite idiopática juvenil
Pontilhado grosso	**U1-SnRNP, U2-6 snRNP**, matriz nuclear	Doença mista do tecido conjuntivo, LES, Raynaud, esclerose sistêmica, síndrome de Sjöegren, doença do tecido conjuntivo indiferenciada
Pontilhado fino	**SSa/Ro, SSb/La, Topo-1,** comum a muitos antígenos	LES, síndrome de Sjöegren, esclerose sistêmica, doença mista do tecido conjuntivo, miopatias inflamatórias
Centrômero	**Cinetocore: CENP-A, B,** C e F	Esclerose sistêmica (forma limitada), Raynaud's
Nucleolar	**PM/Scl,** RNA polimerase, URNP, U3-RNP, To/Th, B23 fosfoproteína/ numatrina	Sobreposição esclerose sistêmica, Raynaud, miopatias inflamatórias
Padrões citoplasmáticos	Antígenos relacionados	Diagnósticos relacionados
Difuso	**RibP, Jo-1,** outras tRNA sintetases, partícula de reconhecimento de sinal (SRP)	LES, miopatias inflamatórias
Pontilhado fino	**Jo-1,** SRP, piruvato desidrogenase (PDH) (mitocôndria)	Miopatias inflamatórias, dermatomiosite, cirrose biliar primária, doença pulmonar intersticial
Padrões menos reconhecidos		
Padrões nucleares	**Antígenos relacionados**	**Diagnósticos relacionados**
Periférico/rim ou envelope nuclear	Lâminas, PAP1/2 gp210, nucleoporina p62; envelope nuclear e complexo de antígenos do poro nuclear	LES, artrite reumatoide, cirrose biliar primária, miopatias inflamatórias, doenças hepáticas autoimunes
Pontilhado fino denso	DFS70/LEDGF-P75	Indivíduos saudáveis e outras condições inflamatórias

(*Continua*)

Tabela 26.4 Padrões nucleares/citoplasmáticos ANA/FAN HEp-2 (RIFI) e antígenos/diagnóstico. (*Continuação*)

Padrões nucleares	Antígenos relacionados	Diagnósticos relacionados
Pontilhado ciclo celular pleomórfico (PCNA)	Antígeno proteico auxiliar na proliferação celular: fator de alongamento da DNA polimerase δ	LES, doenças linfoproliferativas, síndrome de Sjöegren
*Nucleolar ("*clumpy*")*	U3-SnRNP (fibrilarina)	Esclerose sistêmica
*Múltiplos/poucos pontos nucleares ("*dots*")*	Sp100, corpos PML, p-80 coilina	Cirrose biliar primária, hepatite crônica autoimune, síndrome de Sjöegren
Centrosoma/centríolo (anteriormente: aparelho do fuso celular)	Enolase, nineína, pericentrina	Esclerose sistêmica, Raynaud, doença inflamatória
Fuso mitótico	Aparelho mitótico nuclear (NuMA)/ centrofilina	Artrite reumatoide, condições inflamatórias, pneumonia (por *Mycoplasma*)
Padrões citoplasmáticos	**Antígenos relacionados**	**Diagnósticos relacionados**
Pontilhado discreto	Endossoma (endossoma antígeno precoce 1), GW/corpos de processamento, lisossomas/corpos multivesiculares	Condições neurológicas, síndrome de Sjöegren, LES, cirrose biliar primária, doença do tecido conjuntivo indiferenciada
Complexo de Golgi	Proteínas Golgi/golginas: giantina, golgina 245, golgina 110, golgina 97, golgina 95 etc.	LES, síndrome de Sjöegren, artrite reumatoide, ataxia cerebelar
Fibras citoplasmáticas	Actina, citoqueratina, tropomiosina, vimentina	Hepatite crônica autoimune, dermatomiosite e outras doenças inflamatórias

LES = Lúpus eritematoso sistêmico.

Fonte: Adaptada de Agmon-Levin *et al.*, 2014.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. Ann Rheum Dis. 2014;73:17-23.
2. Castro CC, Gourley M. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. J Allergy Clin Immunol. 2009;125(2):S238:S247.
3. Damoiseaux J, Andrade LE, Fritzler MJ, et al. Autoantibodies 2015: From diagnostic biomarkers toward prediction, prognosis and prevention. Autoimmun Rev. 2015;14(6):555-63.
4. González-Buitrago JM, González C. Present and future of the autoimmunity laboratory. Clin Chim Acta. 2006;365: 50-7.
5. Olsen NJ, Karp DR. Autoantibodies and SLE – the threshold for disease. Nat Rev Rheumatol. 2014;10:181-6.
6. Plebami M, Pittoni M, Celadin M, et al. Recent advances in diagnostic technologies for autoimmune diseases. Autoimmun Rev. 2009;8:238-43.
7. Tozzoli R, Bizarro N. The clinical autoimmunologist and the laboratory autoimmunologist: the two sides of the coin. Autoimmun Rev. 2012;11:766-70.

27

capítulo

Ana Lígia Bender ▪ Ana Paula Duarte de Souza ▪ Fernando Thomé Kreutz

Marcadores Tumorais

INTRODUÇÃO

O crescimento de tecidos e órgãos ocorre a partir de uma célula, num processo de diferenciação. Esse processo é complexo e regulado. No câncer, a divisão celular perde o controle, frequentemente como resultado de acúmulo gradual de múltiplas mutações ao longo do tempo. Pequenos crescimentos ocorrem algumas vezes, são bem diferenciados, chamados **benignos**. No câncer, o crescimento é perigoso, descrito como **maligno**, e é predominantemente menos diferenciado. O resultado do crescimento pode resultar em seu espalhamento ou **metástase** da doença (Suresh MR, 2005).

O crescimento neoplásico anormal aumenta o nível e os tipos de substâncias chamadas marcadores de câncer ou **marcadores tumorais**. Esses marcadores aparecem no sangue e outros fluidos corporais devido à perda de polaridade e/ou dano anatômico do tumor. Alguns marcadores tumorais são utilizados como "*screening*" (triagem). Os marcadores tumorais bioquímicos não são suficientemente específicos e sensíveis para serem adotados como definitivos, e as análises laboratoriais devem ser acompanhadas de atento cuidado na escolha do método e possíveis interferentes (Tabelas 27.1 e 27.2) (Suresh MR, 2005; Sturgeon CM, *et al*., 2008).

A Academia Nacional de Bioquímica Clínica *(National Academy of Clinical Biochemistry (NACB))* publicou em 2008 e o AACC (*American Association for Clinical Chemistry*), em 2009, um *guideline* prático para laboratórios clínicos com orientações detalhadas para a utilização de marcadores tumorais nos diferentes níveis de atenção em saúde (Sturgeon CM, *et al*., 2008; Sturgeon CM, & Diamandis EP, 2009).

ALGUMAS RECOMENDAÇÕES DA *NATIONAL ACADEMY OF CLINICAL BIOCHEMISTRY* (STURGEON CM, *ET AL.*, 2008)

Câncer de ovário

O **CA125** é o único marcador que pode ser recomendado para usar em neoplasias de ovário. Novos marcadores são promissores, no entanto, a sua contribuição para o padrão atual de diagnóstico e tratamento são desconhecidos. São necessários mais ensaios clínicos.

A medida do **CA125** pode ser utilizada para monitorar a resposta à quimioterapia. A amostra deve ser colhida duas

Tabela 27.1 Propriedades de um marcador tumoral ideal.

- Alta sensibilidade clínica
- Alta especificidade clínica
- Nível proporcional ao volume do tumor
- Curta meia-vida para marcar rapidamente a resposta ao tratamento
- Refletir a heterogeneidade do tumor
- Baixos níveis em indivíduos saudáveis
- Baixos níveis em doenças benignas
- Capacidade de diferenciar tumor e metástase de estados benignos em indivíduos saudáveis
- Tempo adequado para a detecção a fim de ser útil para o diagnóstico e tratamento precoce
- Ensaios laboratoriais com sensibilidade para detectar tumores no estágio I

Fonte: Suresh MR, 2005; Sturgeon CM, *et al*., 2008.

Tabela 27.2 Requisitos analíticos e potenciais fatores que interferem na dosagem de marcadores séricos para os tumores de células geminativas.

Marcador	Tipo de amostra	Requisito analítico	Interferentes
Marcadores estabelecidos			
Alfafetoproteína (AFP)	Soro ou plasma	Limite de detecção < 1 µg/L	Hepatites, anticorpos heterófilos, dano hepático induzido por drogas, carcinoma hepatocelular
Hormônio da Gonadotrofina Coriônica (hCG)	Soro ou plasma (urina)	Limite de detecção < 2 U/L; reação cruzada com LH < 2%	Elevação do hCG induzida por quimioterapia >10 U/L, anticorpos heterófilos, tumores não trofoblásticos produtores de hCGβ
Lactado desidrogenase (LDH)	Soro	Os valores de referência são método-dependentes, a decisão clínica é baseada no limite superior do valor de referência	Elevação de valores causados por hemólise, doença hepática, doença muscular, infarto do miocárdio
Marcadores experimentais			
hCGβ	Soro ou plasma	Limite de detecção 0,5 pmol/L	Tumores não trofoblásticos
LDH-1	Soro	Valores de referência método-dependente	Hemólise, doença muscular, doença cardíaca
Fosfatase alcalina placentária (PLAP)	Soro	Valores de referência método-dependente	Fumantes podem ter os níveis aumentados em 10 vezes
Enolase neurônio-específica	Soro	Valores de referência método-dependente	Hemólise causa resultados falsamente elevados

Fonte: Suresh MR, 2005.

semanas antes do início do tratamento, e subsequentemente a cada duas a quatro semanas durante o tratamento, e em intervalos de duas a três semanas. O mesmo método deve ser empregado.

A medida do **CA125** na terapia primária é recomendada, bem como no pré e pós-operatório, pois podem ter significado prognóstico. Níveis persistentemente elevados podem indicar mau prognóstico.

O **CA 125** não é recomendado para a triagem em mulheres assintomáticas.

Câncer de mama

Ensaios para **receptores de estrogênio** (**ER**) e de **progesterona** (**PR**) devem ser realizados em todas as pacientes com câncer de mama. O objetivo é identificar pacientes que podem ser tratadas com terapia hormonal. ER e PR também podem ser utilizados para avaliação prognóstica, em curto prazo, em pacientes com diagnóstico recente de câncer de mama.

HER-2 (c-erbB-2) deve ser analisado em todas as pacientes com CA de mama invasivo. O principal objetivo é selecionar pacientes com CA de mama que possam ser tratadas com trastuzumab. Também pode identificar os pacientes que se beneficiam preferencialmente da quimioterapia adjuvante com antraciclinas.

uPA e PAI-1 podem ser utilizados para identificar linfonodo-negativo em pacientes com câncer de mama, que não precisam ou não se beneficiariam com a quimioterapia adjuvante. uPA e PAI-1 deve ser medido por um ELISA validado, utilizando extratos de tumor fresco ou congelado.

CA 15-3, **BR 27,29** e **CEA** não devem ser usados rotineiramente para a detecção precoce de recidivas/metástases em pacientes assintomáticos com câncer de mama diagnosticado. Em combinação com exames clínicos e de imagem, podem ser utilizados para monitorar quimioterapia em pacientes com CA de mama avançado. O aumento sustentado das concentrações desses marcadores sugere progressão da doença.

Testes para mutações **BRCA1** e **BRCA2** podem ser utilizados para mulheres em alto risco de desenvolver CA de mama ou de ovário em famílias de alto risco. Nesses casos, a triagem deve ser iniciada aos 25 a 30 anos de idade.

Câncer colorretal (CRC)

Muitos marcadores diferentes foram avaliados para CRC, e apenas um pequeno número pode ser recomendado para clínica:

CEA no seguimento pós-operatório ou quimioterapia sistêmica.

FOBT no rastreamento de CRC inicial em indivíduos com 50 anos de idade ou mais.

Testes genéticos para **MLH1/MSH2/MSH6/PMS2** para identificar associação hereditária.

TIMP-1 é o marcador plasmático mais promissor. Dados sugerem que é mais sensível do que o CEA para CRC, bem como um fator prognóstico independente para a doença. Esses achados precisam ser confirmados.

Câncer de próstata

A medida de **PSA** no soro tem importância no diagnóstico e no seguimento ao tratamento do CA de próstata.

O da fração livre do PSA (%**fPSA**) é recomendado na diferenciação entre homens com CA de próstata e homens com hipertrofia prostática benigna.

PSA é recomendado para monitoramento ao tratamento do CA de próstata.

A amostra de sangue para dosagem de **PSA** deve ser colhida antes de qualquer manipulação da próstata, e várias semanas após a resolução de prostatite. Também devem ser centrifugadas e refrigeradas em até 2 horas após a colheita. Isso é importante principalmente para a dosagem do **fPSA**, que é mais lábil que o **PSA** total. Amostras que não serão analisadas em 24 horas devem ser congeladas a -20 °C.

A contribuição da variação biológica intraindividual deve ser levada em consideração na análise dos resultados do **PSA.**

Câncer de testículo

Os marcadores tumorais são de importância central no diagnóstico, no estadiamento, na avaliação de risco e no acompanhamento de pacientes com câncer testicular. Vários marcadores séricos foram descritos, mas apenas **AFP**, **hCG**, e **LDH** foram completamente validados, e em que foi demonstrado valor prognóstico independente.

A evolução dos diagnósticos baseados em DNA revelam um número de alterações que poderão, no futuro, permitir estadiamento e avaliação prognóstica mais precisa do CA testicular.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Sturgeon CM, Diamandis EP. Laboratory Medicine Practice Guidelines Use of Tumor Markers in Testicular, Prostate, Colorectal, Breast, and Ovarian Cancers American Association for Clinical Chemistry Inc 2009 84p.
2. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Use of Tumor Markers in Testicular, Prostate, Colorectal, Breast, and Ovarian Cancers. Clin Chem. 2008;54(12):e11-e79.
3. Suresh MR. Cancer Markers The Immunoassay Handbook. Oxford: Elsevier, 2005.

28

capítulo

Ana Lígia Bender ▪ Ana Paula Duarte de Souza ▪ Fernando Thomé Kreutz

Doenças Infecciosas

INTRODUÇÃO

Os seres humanos podem ser infectados e sofrer consequências clínicas a partir de numerosos e diferentes tipos de microrganismos. Na maioria dos casos a infecção é resolvida com ou sem danos teciduais, promovendo a formação de memória imunológica (resposta adaptativa) eficaz. A reinfecção é geralmente subclínica, e, para muitos vírus e bactérias, temos vacinas. No entanto, algumas infecções causam danos substanciais aos tecidos e as lesões podem se tornar crônicas. (Rouse BT, e Sehrawat S, 2010). A transmissão dos patógenos pode ocorrer no pré-natal (através da passagem transplacentária), no perinatal ou no pós-natal (contato com sangue e secreções). São inúmeros agentes causais e as possibilidades diagnósticas laboratoriais.

Neste tópico, abordaremos aquelas infecções em que o setor de imunologia do laboratório clínico é muito solicitado – as infecções **TORCH** – compreendendo **T**oxoplasmose, ***T****reponema pallidum*, **R**ubéola, **C**itomegalovírus (CMV), **H**erpes simples vírus (HSV), vírus da **H**epatite (HAV, HBV, HCV), vírus da imunodeficiência humana (**HI**V) (Neu N, *et al.*, 2015), com enfoque na avaliação da imunidade humoral.

O dia a dia da unidade de imunologia do laboratório clínico envolve em muitos momentos de avaliação de infecções congênitas, onde uma variedade de microrganismos, ao infectar a placenta e as membranas coriônicas, causa a infecção fetal (Erlebacher A, 2013). O feto atingido pode apresentar anomalias no crescimento e desenvolvimento com múltiplas alterações clínicas e laboratoriais. Para muitos dos patógenos associados às infecções congênitas há tratamento e/ou estratégias de prevenção. O diagnóstico precoce, incluindo os exames pré-natais, é fundamental.

Toxoplasmose	
Descrição	A toxoplasmose é uma zoonose cosmopolita, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. Apresenta quadro clínico variado, desde infecção assintomática a manifestações sistêmicas extremamente graves. Do ponto de vista prático, é importante fazer uma distinção entre as manifestações da doença (ocular, neonatal, febril aguda, da gravidez, do imunodeprimido ou linfadenite)
Transmissão	Ingestão de cistos teciduais de carne malcozida; ingestão de oocistos do contato com fezes de gatos, solo ou comida contaminada; transfusão ou transplante de órgãos.
Diagnóstico imunológico laboratorial	Anticorpos *antitoxoplasma gondii*-IgM (Imunocaptura): alta taxa de falso-positivos. Anticorpo pode persistir na circulação por até dois anos após a infecção aguda. Anticorpos *antitoxoplasma gondii*-IgG: • O aumento significativo dos níveis de anticorpos da classe IgG indica a presença de infecção ativa. Níveis de anticorpos IgG baixos e estáveis podem representar infecções crônicas, passadas ou persistentes. Um teste negativo praticamente descarta uma condição clínica suspeita, fazendo-se necessária nova sorologia para descarte, de oito a dez dias após a primeira. Teste de avidez de anticorpos IgG específicos: • Auxilia na determinação do tempo de infecção. Anticorpos de alta avidez indicam que a infecção aguda ocorreu há três ou quatro meses. Anticorpos *antitoxoplasma gondii*-IgA (Imunocaptura): • Para alguns autores é mais sensível que a detecção dos anticorpos IgM específicos, com resultados positivos por oito meses ou mais.
Observação	Reação em cadeia da polimerase (PCR), muito utilizada na análise do líquido amniótico, auxilia na determinação da infecção fetal e também na análise do líquido cerebroespinhal (líquor).

Fonte: Neu N, *et al.*, 2015; Ministério da Saúde, 2010; Takei K. 2007.

***Treponema pallidum* (sífilis)**	
Descrição	Sífilis é uma doença infectocontagiosa sistêmica, de evolução crônica, com manifestações cutâneas temporárias, provocadas por uma espiroqueta, *Treponema pallidum.* Sua evolução é dividida em recente e tardia.
Transmissão	A transmissão da sífilis adquirida é sexual, na área genitoanal, na quase totalidade dos casos. Na sífilis congênita, há infecção fetal via hematogênica, em qualquer fase gestacional ou estágio clínico da doença materna. A transmissão por transfusão sanguínea é rara nos dias atuais.
Diagnóstico imunológico laboratorial	Testes sorológicos não treponêmicos: VDRL (*Veneral Disease Research Laboratories*), RPR (*Rapid Plasma Regain test*) – detectam anticorpos cardiolipídicos. Recomendada diluição da amostra para evitar efeito pró-zona. O VDRL é indicado para o diagnóstico e seguimento terapêutico, por ser semiquantitativo. A sensibilidade do teste, na fase primária, é de 78%, elevando-se nas fases secundária (100%) e latente (cerca de 96%). A especificidade do teste é de 98%. Após instituído o tratamento, o VDRL apresenta queda progressiva nas titulações, podendo resultar reagente por longos períodos, mesmo após a cura da infecção (cicatriz sorológica). Testes sorológicos treponêmicos: Confirmação de testes não treponêmicos reativos: FTA.ABS (*Fluorescent antibody absortion*); MHA.TP (micro-hemaglutinação para *T. pallidum*); *T. pallidum* (enzima imunoensaio); *T. pallidum* aglutinação de partículas. A sensibilidade dos testes treponêmicos na sífilis adquirida é de 84% na fase primária, de 100% nas fases secundária e latente, e de cerca de 96% na sífilis terciária
Observação	O comprometimento do sistema nervoso é comprovado pelo exame do líquor.

Fonte: Neu N, *et al.*, 2015; Ministério da Saúde, 2010.

Rubéola	
Descrição	Doença exantemática viral aguda, causada por um vírus RNA de cadeia simples. É caracterizada por febre baixa e exantema maculopapular, que é precedido, em cinco a dez dias, por linfadenopatia generalizada. Adolescentes e adultos podem apresentar poliartralgia, poliartrite, conjuntivite, coriza e tosse. Cerca de 25% a 50% das infecções pelo vírus da rubéola são subclínicas. Tem curso benigno, e toda sua importância epidemiológica está relacionada à síndrome da Rubéola Congênita, quando a doença ocorre nos cinco primeiros meses da gestação, podendo resultar em aborto, natimorto, malformações congênitas.
Transmissão	Direta, pelo contato com secreções nasofaríngeas de pessoas infectadas. A infecção é adquirida por via intrauterina (transmissão vertical). Prevenção pela vacinação.
Diagnóstico imunológico laboratorial	**Anticorpos antirrubéola-IgM (imunocaptura):** se reagente, confirmar o caso (aumento nas concentrações séricas dos anticorpos antirrubéola-IgG). **Anticorpos antirrubéola-IgG:** reagente estável e/ou em níveis baixos em amostras pareadas (em oito a dez dias após a primeira), praticamente descarta a condição clínica suspeita de rubéola (paciente imune); reagente em níveis significativamente ascendentes indica suspeita de contato recente e deve ser confirmado. **Anticorpos antirrubéola-IgG avidez:** auxiliam na exclusão de contato recente com o vírus da rubéola. **Investigação em suspeita de rubéola congênita:** O feto infectado é capaz de produzir anticorpos específicos da classe IgM e IgG antirrubéola, antes mesmo do nascimento. A presença de anticorpos IgM específicos no sangue do recém-nascido é evidência de infecção congênita e deve ser confirmada. Os anticorpos IgM podem ser detectados em 100% das crianças com síndrome da rubéola congênita até o 5º mês; em 60%, entre o 6º e o 12º mês; e em 40%, do 12º ao 18º mês.
Observação	A coleta de sangue deve ser feita logo no primeiro contato com caso suspeito. Amostras coletadas após 28 dias são consideradas tardias, mas mesmo assim devem ser encaminhadas ao laboratório para a realização da pesquisa de anticorpos IgM específicos. É importante ressaltar que resultados não reagentes para IgM não descartam a possibilidade de infecção recente pelo vírus da rubéola.

Fonte: Neu N, *et al.*, 2015; Ministério da Saúde, 2010.

Citomegalovírus (CMV)	
Descrição	Citomegalovírus (CMV) é um vírus de DNA de cadeia dupla, um membro da família ***Herpesviridae***. CMV geralmente provoca uma infecção assintomática ou apresenta sintomas semelhantes aos da gripe leve; depois, ele permanece latente durante toda a vida e pode reativar. Em indivíduos imunocomprometidos a doença sintomática geralmente se manifesta como uma síndrome de mononucleose. Doença sintomática de CMV pode afetar quase todos os órgãos do corpo, resultando em febre de origem desconhecida, pneumonia, hepatite, encefalite, mielite, colite, uveíte, retinite, e neuropatia. Em pacientes com infecção por HIV, CMV envolve todo o trato gastrintestinal. A retinopatia é a manifestação mais comum da doença CMV em pacientes que são HIV positivo. A infecção congênita é comum, e os bebês podem ser acometidos com manifestações que incluem perda auditiva neurossensorial, deficiência visual, retardo mental e defeitos cognitivos; 4% das crianças infectadas não sobrevivem.
Transmissão	O CMV é transmitido por contato da superfície mucosa com a secreção infectada (saliva, urina, sangue, leite materno, secreções), transfusões e transplante de órgãos.
Diagnóstico Imunológico laboratorial	**Anticorpos anti-CMV-IgM (imunocaptura):** marcador transitório sensível de infecção primária com especificidade limitada. **Anticorpos anti-CMV-IgG:** são detectados precocemente, com pico em um a dois meses após o início da infecção e persistem pela vida toda (Figura 28.1). Os ***anticorpos anti-CMV-IgG-Avidez*** têm se mostrado um marcador sensível e específico, muito útil na avaliação diagnóstica diferencial da infecção primária citomegálica. IgG específica de alta avidez exclui infecção primária.
Observações	Testes moleculares quantitativos têm apresentado alta correlação com a doença citomegálica pós-transplante. A antigenemia para CMV tem sido utilizada com sucesso em muitos centros de transplantes. No entanto, não se correlaciona de modo eficiente com a cinética de replicação do vírus. Foi demonstrado em infecções primárias por CMV dissociação entre as curvas de DNAemia e antigenemia CMV.

Fonte: Prince HE, e Lapé-Nixon M 2014; Gerna G, e Lilleri D, 2006; Takei K, 2007.

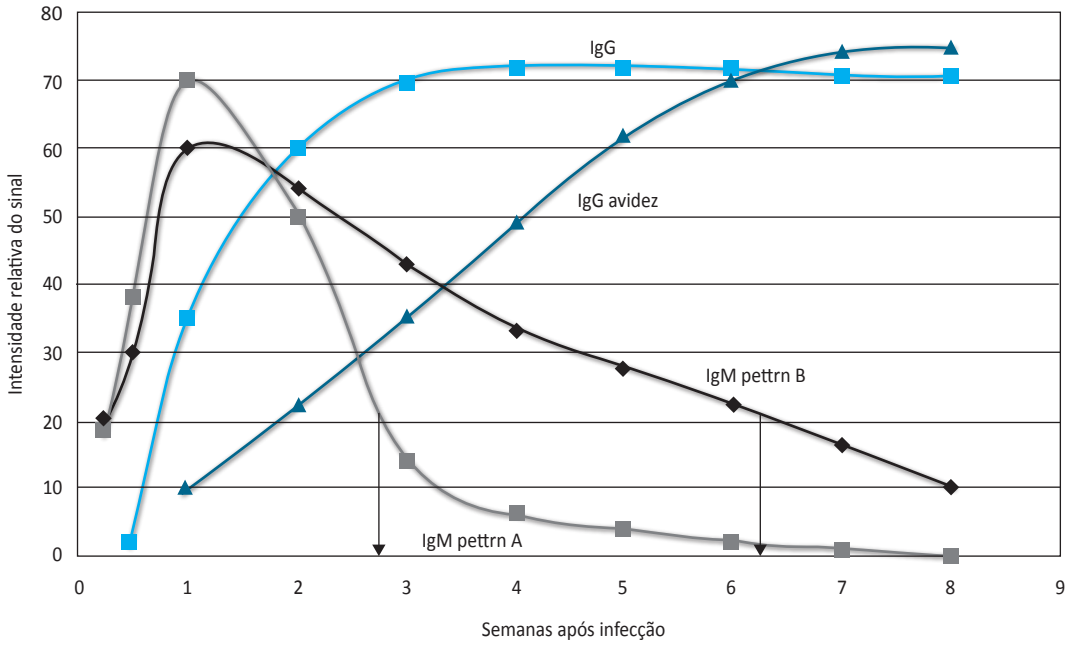


Figura 28.1 Cinética da resposta imune humoral da infecção pelo CMV.
(CMV IgM, IgG, e IgG avidez).
Fonte: Prince HE, e Lapé-Nixon, 2014.

Herpes simples (HSV)	
Descrição	O vírus Herpes Simples é comumente associado a lesões de membranas mucosas e pele, ao redor da cavidade oral (herpes orolabial) e da genitália (herpes anogenital). Há dois tipos de vírus: o tipo 1, responsável por infecções na face e no tronco, e o tipo 2, relacionado às infecções na genitália e de transmissão geralmente sexual. Ambos podem infectar qualquer área da pele ou das mucosas. As manifestações clínicas são distintas e relacionadas ao estado imunológico do hospedeiro. Além dos quadros nos imunodeprimidos, de grande importância, a infecção herpética congênita/perinatal, a doença neurológica.
Transmissão	A transmissão se dá pelo contato direto com lesões ou objetos contaminados, pelo contato sexual, transfusões de sangue e transplante de órgãos.
Diagnóstico Imunológico laboratorial	A pesquisa de anticorpos específicos (anti-HSV-IgG e anti-HSV-IgM) tem importância na identificação da soroprevalência ou confirmação da soroconversão. Os testes imunoenzimáticos podem ser tipo-específicos se utilizarem proteínas recombinantes gG1 e gG2. O diagnóstico da infecção herpética é eminentemente clínico. O diagnóstico citológico pode ser utilizado. O isolamento do vírus é a técnica mais específica. A reação em cadeia da polimerase é altamente sensível.

Fonte: Ministério da Saúde, 2010; Takei K, 2007.

Hepatite A	
Descrição	Doença viral aguda, causada pelo vírus RNA da família *Picornaviridae*, de manifestações clínicas variadas, desde formas subclínicas, oligossintomáticas e até fulminantes (entre 2% e 8% dos casos).
Transmissão	Fecal-oral, água, pessoa a pessoa, alimentos e objetos contaminados. Transmissão e parenteral (transfusão) são muito raras, devido ao curto período de viremia.
Diagnóstico Imunológico laboratorial	**Anticorpo anti-HAV IgM** é positivo na infecção aguda (desde o início da sintomatologia). Anticorpo anti-HAV IgG é positivo na infecção passada e na vacinação (é detectado uma semana após o início dos sintomas, que se mantêm ao longo da vida).

Fonte: Ministério da Saúde, 2010.

Hepatite B	
Descrição	Doença viral causada pelo vírus DNA da família *Hepadnaviridae,* que cursa de forma assintomática ou sintomática (até formas fulminantes). As formas sintomáticas são caracterizadas por mal-estar, cefaleia, febre baixa, anorexia, astenia, fadiga, artralgia, náuseas, vômitos, desconforto no hipocôndrio direito e aversão a alguns alimentos. Algumas pessoas desenvolvem a forma crônica, mantendo um processo inflamatório hepático por mais de seis meses. O risco de cronificação depende da idade na qual ocorre a infecção. Assim, em menores de um ano de idade chega a 90%, entre um e cinco anos o risco varia entre 20% e 50%, e em adultos, entre 5% e 10%. Portadores de imunodeficiência congênita ou adquirida evoluem para a cronicidade com maior frequência.
Transmissão	Via sexual, por transfusões de sangue, procedimentos médicos e odontológicos, hemodiálises sem as adequadas normas de biossegurança, pela transmissão vertical (mãe-filho), por contatos íntimos domiciliares, acidentes perfurocortantes.
Diagnóstico imunológico laboratorial	**HBsAg (antígeno de superfície da hepatite B):** fase aguda. Sua presença por mais de 24 semanas é indicativa de hepatite B crônica. Anticorpos contra o antígeno do core (Anti-HBc): • **Anti-HBc-IgM:** primeiro anticorpo a ser detectável após o início da infecção. • **Anti-HBc-IgG:** é detectável por muitos anos, marca uma exposição ao HBV no presente ou no passado. Os ***kits*** que medem anticorpos anti-HBc totais detectam IgM e IgG anti-HBc). • **HBeAg:** é detectado no sangue logo após a detecção do HBsAg. Sua presença está associada à intensa replicação viral, podendo persistir por dez semanas na hepatite B aguda. • **Anti-HBe:** a produção de anticorpos contra o antígeno HBe é associada a um bom prognóstico, com a diminuição da replicação viral e o início da resposta imune protetora à hepatite B. • **Anti-HBs:** é o último marcador a ser detectado, geralmente entre uma e dez semanas após a negativação do HBsAg. Indica imunidade ao HBV.

Fonte: Ministério da Saúde, 2010; Takei K, 2007.

Hepatite C	
Descrição	Doença viral, com infecções assintomáticas ou sintomáticas (até formas fulminantes, raras), causada por vírus RNA com seis genótipos principais. A taxa de cronificação varia entre 60% e 90%, sendo maior em função de alguns fatores do hospedeiro (sexo masculino, imunodeficiências, idade maior que 40 anos). Em média, de 1/4 a 1/3 dos pacientes evolui para formas histológicas graves, num período de vinte anos. Esse quadro crônico pode ter evolução para cirrose e hepatocarcinoma, fazendo com que o HCV seja, hoje em dia, responsável pela maioria dos transplantes hepáticos no Ocidente.
Transmissão	A transmissão ocorre, principalmente, por via parenteral. A transmissão sexual pode ocorrer em pessoas com múltiplos parceiros e com prática sexual de risco. A transmissão intrauterina é incomum.
Diagnóstico imunológico laboratorial	Anticorpos anti-HCV-IgG: indica contato prévio com o agente, entretanto não define se é infecção aguda ou pregressa e curada espontaneamente, ou se houve cronificação da doença. *A presença do vírus deve ser confirmada pela pesquisa qualitativa e quantitativa do HCV-RNA e genotipagem.*

Fonte: Neu N, *et al.*, 2015; Ministério da Saúde, 2010; Takei K, 2007.

Vírus da imunodeficiência humana (HIV)	
Descrição	O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um retrovírus da família ***Lentiviridae***. Causa uma grave disfunção do sistema imunológico, à medida que vão sendo destruídos os linfócitos T CD4+, uma das principais células-alvo do vírus.
Transmissão	Via sexual, sangue, leite materno, transplantes de órgãos, transfusões, acidentes com materiais perfurocortantes.
Diagnóstico imunológico laboratorial	Contagem de células TCD4+: marcador utilizado tanto para estimar o prognóstico e avaliar a indicação de início de terapia antirretroviral quanto para definição de casos de Aids. Os testes diagnósticos são baseados na detecção de anticorpos anti-HIV, do RNA do HIV e de componentes do vírus no sangue como o antígeno P24. A pesquisa de anticorpos é a mais empregada na identificação dos infectados e baseia-se em imunoensaios marcados. Os imunoensaios estão sujeitos a resultados falso-positivos e falso-negativos. Todas as amostras com resultados positivos ou inconclusivos nos testes de triagem necessitam ser submetidos a um teste confirmatório antes da liberação do resultado final ao paciente. As Figuras 28.2, 28.3, apresentam os marcadores sanguíneos da infecção e o fluxograma diagnóstico laboratorial para detecção precoce da infecção. publicados pelo Ministério da Saúde no Manual Técnico para Diagnóstico de HIV/AIDS de 2013.
Observações	Os algoritmos para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV/Aids que estabelecem os procedimentos sequenciados é disponibilizado pelo Ministério da Saúde em www.aids.gov.br.

Fonte: Ministério da Saúde, 2013; Ministério da Saúde, 2010; Takei K, 2007.

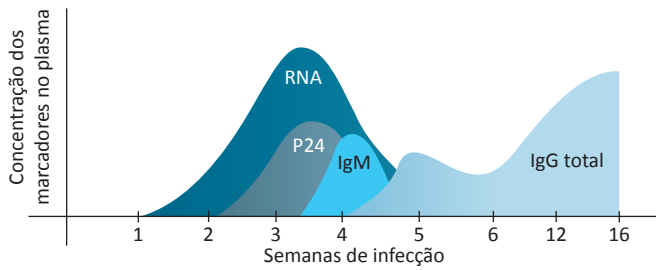


Figura 28.2 Marcadores da infecção pelo HIV na corrente sanguínea de acordo com o período que surgem, após a infecção, seu desaparecimento ou manutenção ao longo do tempo.
Fonte: Adaptada de Ministério da Saúde, 2013.

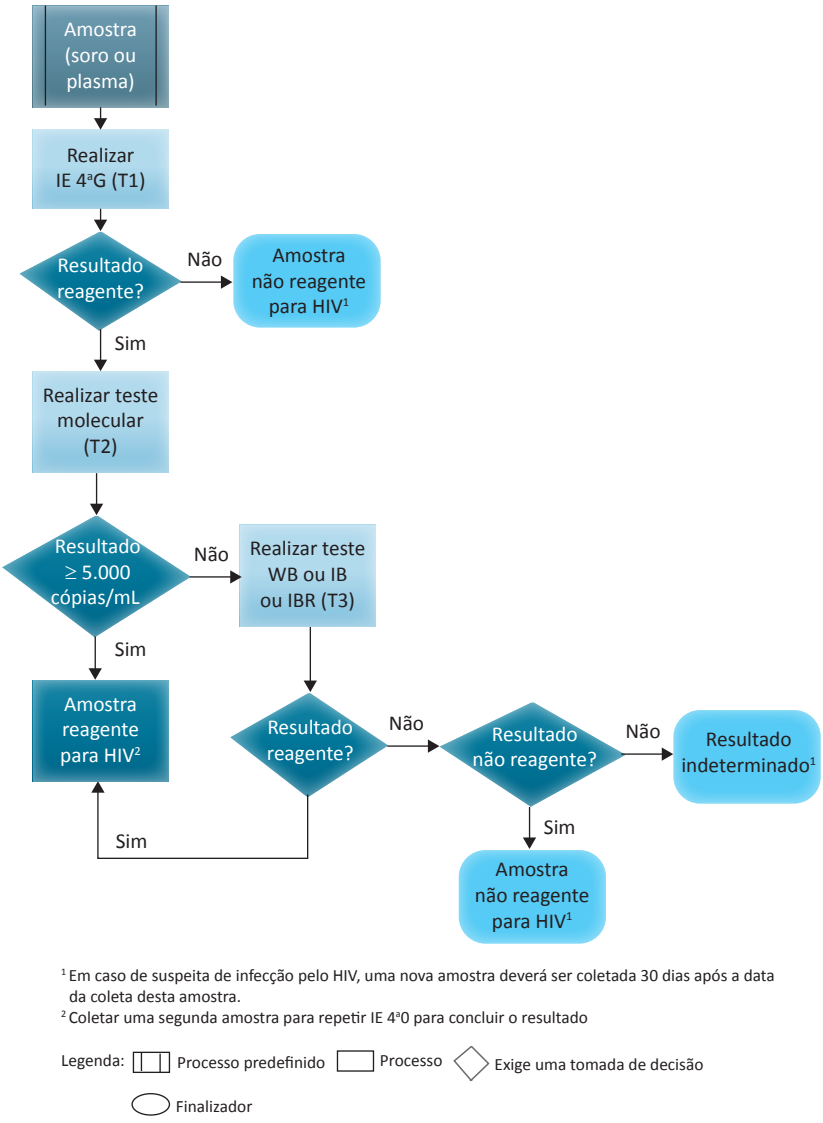


Figura 28.3 Imunoensaio de 4ª geração + teste molecular - permite a detecção mais precoce da infecção pelo HIV.
Fonte: Adaptada de Ministério da Saúde, 2013.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 8.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
3. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. Annu Rev Immunol. 2013;31:387-411.
4. Gerna G, Lilleri D. Monitoring Transplant Patients for Human Cytomegalovirus: Diagnostic Update. Herpes. 2006 May;13(1):4-11.
5. Neu N, Duchon J, Zachariah P. TORCH infections. Clin Perinatol. 2015;42:77-103.
6. Prince HE, Lapé-Nixon M. Role of Cytomegalovirus (CMV) IgG Avidity Testing in Diagnosing Primary CMV Infection during Pregnancy. Clin Vaccine Immunol. 2014;10:1377-84.
7. Rouse BT, Sehrawat S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? Nat Rev Immunol. 2010;10:514-26.
8. Takei K. Infecções congênitas e perinatais Imunoensaios – fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

PARTE

7

Microbiologia

Pedro Alves d'Azevedo

29

capítulo

Lauro Santos Filho

Montagem e Gerenciamento do Laboratório de Microbiologia

INTRODUÇÃO

Pelo menos uma vez em nossa trajetória profissional é possivel estarmos envolvidos com um projeto de montagem de um laboratório, seja na construção de novas instalações físicas ou reforma de uma estrutura já existente, com adaptação aos novos avanços tecnológicos na área, ou revisão de normas e recomendações que afetam a construção de um laboratório, estabelecendo de forma objetiva os requisitos mínimos a serem considerados.

Na atividade das Análises Clínicas a estrutura laboratorial necessita constantemente se adequar às novas exigências ou demandas de mercado, com mudanças que envolvem projetos de construção/expansão, visando implantar novas tecnologias ou devido às exigências estabelecidas pelas agências reguladoras para acreditação, fiscalização e otimização dos processos ou melhoria na produtividade.

O assunto é um tanto estéril em termos de publicações disponíveis, e, na maioria dos casos, é utilizada a vivência profissional dos mais experientes, aliada à disponibilidade de manuais ou normas direcionadas para instituições públicas, que devem ser adaptadas para laboratórios privados. Por outro lado, é bastante utilizado o recurso de visitas técnicas a outras empresas já instaladas, na tentativa de assimilar inovações ou soluções práticas adotadas a situções específicas. Considerando-se, ainda, que a ideia é geralmente de montagem de um laboratório como um todo, torna-se difícil elaborar um projeto isolado para um setor em particular, considerando a interligação e a dinâmica de funcionamento das diversas especialidades que compõem o laboratório clínico, seja hospitalar ou ambulatorial, privado ou vinculado a uma instituição pública.

Os avanços na tecnologia e a implementação de novos conceitos na legislação dos cuidados em saúde têm adicionado uma significativa complexidade na prática atual de serviços laboratoriais, cuja área inclui as etapas **pré-analítica** (*solicitação, obtenção e transporte de amostras*), que em microbiologia tem papel fundamental, bem como a etapa **analítica** (*realização do exame no menor tempo possível*), e a fase **pós-analítica** *(preparação, transmissão dos resultados e arquivo de dados)*.

Os princípios abordados podem ser aplicados tanto a pequenos como a grandes estruturas, necessitando apenas de configurações mais complexas no último caso. Por outro lado, é importante lembrar que um ambiente seguro e agradável influi de forma positiva, aumentando a eficiência do pessoal e incrementando a produtividade. Com esta finalidade, o planejamento do laboratório começa com uma análise detalhada dos principais fatores que influenciarão o rumo e os resultados dessa etapa preliminar, e dentro desse contexto devem ser inseridos os aspectos específicos do setor de microbiologia. Alguns outros fatores podem surgir em forma de restrições ou de condições limitantes à execução plena do projeto.

PRINCÍPIOS DO PLANEJAMENTO

Os principais aspectos do planejamento de um laboratório são: segurança do pessoal, proteção da amostra, precisão dos resultados, eficiência no fluxo de trabalho, assim como a proteção do meio ambiente e dos riscos provenientes das atividades realizadas no seu interior. As necessidades e características são únicas e específicas para cada projeto de laboratório, no entanto muitos aspectos gerais e principalmente aqueles de natureza técnica podem ser extrapolados e utilizados com as devidas adaptações em outras situações.

Projetos desse tipo tornam-se frequentemente obsoletos em poucos anos, razão pela qual se deve atentar para uma elevada flexibilidade operacional que permita adaptações aos novos avanços técnicos. O sucesso de um projeto depende do planejamento prévio, adequando-se o organograma e o fluxograma do laboratório à programação pretendida, de modo que o resultado final possa oferecer condições técnicas adequadas ao trabalho, aliado a uma aparência esteticamente agradável.

Como em diversas outras áreas da atividade produtiva, atualmente existe um elevado grau de profissionalização no trabalho laboratorial, refletida pelo recrutamento de profissionais que contemplem, além da área de diagnóstico propriamente dita, um suporte em atividades como adminis-

tração de pessoal, *marketing*, informatização, relações humanas, e programação visual. Surgem, então, as grandes corporações, que atualmente direcionam suas atividades para a prestação de serviços de suporte a empresas menores, acompanhando uma tendência global que deve ser considerada por ocasião das diversas etapas de planejamento. Utilizando os dados iniciais, os problemas de organização são definidos em várias etapas sequenciadas:

a) **Estudo preliminar:** estudo de viabilidade que visa a escolher as alternativas que melhor correspondam aos objetivos traçados ou pretendidos.
b) **Anteprojeto:** etapa conduzida com assessoria qualificada, com definição técnica e dimensional da solução proposta, contendo a indicação precisa de todos os componentes e materiais a serem utilizados.
c) **Projeto executivo:** elaborado para atender às exigências técnicas, com a descrição de todos os detalhes técnicos, que irão orientar a montagem ou a instalação de todos os elementos previstos no sistema proposto.

Nessa etapa são definidas as necessidades específicas dos itens a seguir discriminados, em decorrência do volume de trabalho previsto ou da demanda projetada:

- Número de ambientes e definição da área total necessária em m^2.
- Sistemas de iluminação e ventilação.
- Revestimento cerâmico de piso e pintura das paredes.
- Rede hidráulica, elétrica e de telefonia: localização e dimensionamento.
- Computação: interligação dos setores, com interface de equipamentos.
- Programação visual: sinalização, identificação dos setores e quadros de avisos.
- Mobiliário: bancadas modulares, bancos, cadeiras, armários e mesas de trabalho.

CARACTERÍSTICAS PARA A CONSTRUÇÃO DE UM LABORATÓRIO

Tamanho do ambiente

Não existe um critério definido sobre as medidas que os laboratórios devem ter, mas apenas recomendações contidas em algumas normas técnicas de acordo com o volume de trabalho a ser realizado e no pessoal necessário a essa função. Deverá haver algumas considerações a respeito das atividades a serem desenvolvidas, e, desse modo, os laboratórios que desenvolvem atividades de ensino/pesquisa, além de sua função assistencial, requerem um espaço maior para a realização dessas tarefas, com uma projeção mínima da expansão. Diferentes normas técnicas estabelecem que os espaços destinados aos laboratórios clínicos devam atender a alguns requisitos específicos, especialmente a área de microbiologia, cujo trabalho requer condições especiais de segurança.

É recomendado que o espaço destinado à atividade laboratorial tenha de 14 a 18 m^2 por técnico, e que esse pessoal seja proporcional à capacidade instalada do setor. Os postos ou estações de trabalho situados em mesas ou bancadas devem ter uma superfície de trabalho de 50 × 1,60 metro, e altura de 75 a 90 centímetros, para que possa proporcionar equilíbrio e comodidade. As cadeiras ou bancos devem ser alcochoados e com respaldo, com largura de 40 cm, profundidade de 38 a 42 cm, e serem reguláveis em altura. Além disso, todos os equipamentos do laboratório devem estar situados em espaços que permitam seu fácil manuseio, e que sejam suficientemente amplos para permitir trabalhos de limpeza, manutenção e eventual conserto.

Divisões das áreas

A diferenciação dos locais específicos de execução dos exames do restante das áreas auxiliares permite melhor controle do risco, diminuindo os custos na gestão de resíduos e determinação dos sistemas de ventilação e refrigeração. Algumas normas técnicas específicas estabelecem que a manipulação de agentes biológicos deva ser executada em áreas com seus correspondentes níveis de contenção. Todas as áreas de trabalho devem ser sinalizadas com o símbolo de risco biológico, o correspondente nível de contenção adotado, assim como etiquetas indicando: *risco biológico* ou *medidas de proteção obrigatórias*. O termo contenção é usado para descrever os métodos de segurança utilizados na manipulação de materiais infecciosos em um local onde estejam sendo manejados ou mantidos, sendo seu objetivo reduzir ou eliminar a exposição da equipe de trabalho, de outras pessoas e do meio ambiente em geral aos agentes potencialmente perigosos.

A contenção primária consiste na proteção da equipe do laboratório e do meio de trabalho contra a exposição aos agentes infecciosos, proporcionada por um bom desempenho técnico em microbiologia e pelo uso dos equipamentos de segurança adequados. Nesse contexto, o uso de vacinas pode fornecer um elevado nível de proteção pessoal. Já a contenção secundária envolve a proteção do meio ambiente externo ao laboratório contra a exposição aos materiais infecciosos, sendo proporcionada pela combinação de um projeto das instalações físicas aliadas às boas praticas operacionais. Dessa forma, os três elementos de contenção incluem: **a)** prática e técnica laboratorial; **b)** equipamento de segurança; e **c)** projeto das instalações físicas. A avaliação do risco do trabalho a ser realizado com um agente específico determinará a combinação adequada desses três elementos.

a) Área administrativa: O laboratório deve contar com alguns espaços destinados a aspectos administrativos, que geralmente se localizam próximos à entrada, o que facilita o acesso do pessoal externo sem interferir nas atividades analíticas. É o local onde geralmente são instalados os computadores para emissão de laudos, análises de resultados, elaboração de mapas, planilhas e banco de dados.

b) Coleta e/ou recepção de amostras clínicas: O material destinado ao setor de microbiologia é obti-

do na área de coleta geral do laboratório de Análises Clínicas, seguido de uma triagem. No entanto, existe uma prática corrente do recebimento de amostras oriundas de outros serviços e de hospitais conveniados, devendo-se nesses casos serem adotados critérios rigorosos na aceitabilidade das amostras, levando-se em consideração aspectos como: tempo entre a coleta e a chegada do material ao laboratório, condições de transporte e manutenção das amostras clínicas, meios de transporte utilizados, refrigeração do material etc.

c) **Área de trabalho (analítica):** Local em que os exames são efetivamente realizados, possuindo características específicas e, portanto, barreiras de contenção. Deve-se dar especial atenção à instalação de bicos de gás, segundo normas de segurança, assim como a presença de pias para coloração de lâminas e lavagem de mãos. A instalação de gás deve ser feita na área externa, e em local seguro e ventilado, conectado mediante tubulação (geralmente de cobre) às bancadas de trabalho, onde se instalam os bicos utilizando-se mangueiras de pressão padronizadas.

d) **Área de preparo de meios de cultura:** Existe uma tendência para a aquisição de meios e reagentes pré-fabricados, no entanto para os laboratórios que preparam os meios de cultura devem dispor de um local próximo à área de esterilização. Após o preparo e teste de esterilidade, os meios são armazenados em refrigeradores próprios, diferenciados dos que se destinam ao armazenamento de amostras clínicas (*em fase analítica*) ou material para descarte (*armazenamento temporário*).

Limpeza, esterilização e eliminação de resíduos

É cada vez mais rotineiro o uso de materiais descartáveis, assim como meios de cultura e reagentes comerciais preparados, diminuindo muito o trabalho de lavagem e esterilização. Desse modo, a área destinada a essa finalidade deve adaptar-se aos protocolos adotados, que deve estar de acordo com as normas vigentes de eliminação de resíduos. As instalações e os equipamentos dessa área devem atender ao nível de contenção correspondente, e com acesso restrito apenas para pessoal treinado. A área deve dispor de pelo menos um refrigerador (*para material a ser descartado*), autoclave e estufa de alta temperatura para esterilização, instalados segundo normas específicas, com troca permanente de ar no ambiente destinado a essas atividades.

As salas destinadas ao trabalho de microbiologia deverão ter piso com revestimento cerâmico, as paredes devem ter acabamento de material facilmente lavável, e a iluminação deverá ser adequada. As bancadas destinadas à realização de exames devem ter revestimento impermeável (*laminado plástico, aço inoxidável ou pintura epóxi*) para oferecer durabilidade, assim como facilitar a limpeza e a descontaminação.

O ambiente laboratorial, de preferência refrigerado, deve oferecer condições para circulação do ar, no entanto, a área de processamento de amostras deverá ser mais confinada, evitando-se o fluxo direto de ar. Apesar de não constituir uma condição indispensável ao funcionamento da rotina do setor, é importante dispor de uma capela de fluxo laminar, onde o trabalho de inoculação de amostras será realizado com risco mínimo de contaminação. Nos laboratórios destinados ao manuseio e cultivo de amostras de escarro com isolamento de *Mycobacterium tuberculosis* é recomendado dispor de uma sala específica para esta finalidade.

RECURSOS MATERIAIS

O equipamento, assim como a aparelhagem mínima e o material de consumo necessário ao funcionamento de um laboratório devem estar dimensionados também de acordo com a demanda de trabalho, e varia de acordo com o tipo e dimensões, constando de:

1. **Equipamento e mobiliário básico:** Autoclave vertical, Estufa de Esterilização, Estufa Bacteriológica, Balança semi-analítica, Destilador, Centrífuga, Microscópio binocular, Forno de Micro-ondas; Refrigeradores, Bancadas e Armários Padronizados.
2. **Material permanente/diverso:** Pinças, Alças, Espátulas, Estantes etc.
3. **Vidraria:** balões, placas, provetas, lâminas, tubos, frascos etc.
4. **Reagentes, meios de cultura e material de limpeza:** Meios de cultura desidratados, substâncias usadas na preparação de reagentes, material de limpeza, e outros itens de consumo – difíceis de serem listados – dependem do tipo e volume da rotina a ser adotada. A utilização de meios descartáveis determina uma alteração na rotina, e nesse caso há substancial redução do material em estoque, assim como do espaço físico necessário.

RECURSOS HUMANOS

Os recursos humanos do setor de microbiologia estão na razão direta da demanda de exames e tipo de rotina a ser estabelecida.

a) **Nível superior:** profissional(is) especializado(s) em microbiologia e com funções de supervisão, administração, execução e controle de qualidade.

b) **Nível médio/básico:** técnico(s) responsáve(is) pelo preparo de reagentes e meios, trabalho de bancada e treinados no desempenho de outras funções como limpeza geral e manutenção do laboratório. Toda a equipe deve saber manusear e aferir o funcionamento de todos os equipamentos existentes no setor, ter conhecimento de como agir em situações de emergência, e ser identificada com o manejo e localização dos equipamentos de segurança.

GERENCIAMENTO FINANCEIRO E ADMINISTRATIVO

A aquisição de qualquer material deverá ser baseada em critérios técnicos e principalmente em aspectos ligados a custos e desempenho dos equipamentos ou reagentes utilizados.

a) **Custo direto ou total:** custo do material acrescido do custo do trabalho.
b) **Custos indiretos:** representam um percentual de 40% a 50% do total.
   - Supervisão do setor: desempenho dos testes.
   - Controle de qualidade: interno e externo.
   - Conservação e manutenção de equipamentos: mapas de controle.
   - Educação continuada: cursos, congressos, treinamento etc.
   - Infraestrutura: instalações físicas, água, luz, telefone, computação.
   - Taxas/licenças anuais e depreciação do equipamento.
c) **Controle administrativo:** compete ao diretor-geral ou supervisor do setor, e está relacionado ao controle dos seguintes itens:
   - Entrada e saída de material de consumo: cadastro de fornecedores
   - Reposição de material: planejamento e aquisição
   - Controle, registro e liberação de resultados: com padronização de laudos.

CONTROLE DE QUALIDADE

Um programa de Controle de Qualidade (CQ) tem como objetivo primário assegurar e garantir a exatidão dos resultados, sendo sua meta permanente a melhoria do laboratório através da avaliação periódica, educação continuada e atualização técnica, de modo que fica difícil conceber o funcionamento de um laboratório sem o suporte eficaz de um programa de CQ.

a) **Controle de pessoal:** é essencial a participação de pessoal experiente e treinado para a realização de testes com finalidade de aferir o desempenho do laboratório.
b) **Manual de procedimentos:** procedimento operacional padrão (POP), compilação de todos os testes realizados no laboratório, escritos em formato passo a passo, o que possibilita uma padronização do trabalho.

Controle de qualidade interno

São necessários alguns procedimentos definidos:

- Padronização de técnicas de coleta, transporte e manutenção de amostras.
- Controle do funcionamento e manutenção de equipamentos: mapas.
- Controle de meios e provas de identificação: linhagens bacterianas padronizadas.

Controle de qualidade externo

Vinculação a um órgão ou instituição com a finalidade de proceder à realização de testes de proficiência utilizando procedimentos comparativos com material externo. Deste modo, é realizada a avaliação dos procedimentos, reagentes e equipamentos, detectando-se alterações em vários níveis.

Atualmente estão disponíveis programas ligados a associações vinculadas à atividade laboratorial, destacando-se o Programa Nacional de Controle de Qualidade (**PNCQ)** da Sociedade de Análises Clínicas (**SBAC**), que oferece material bibliográfico para consulta, assim como suporte adequado em termos de treinamento, cursos e assessoria técnico-científica de alto padrão.

INTRODUÇÃO À ROTINA DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA

O diagnóstico das doenças de natureza bacteriana, geralmente, está fundamentado na detecção e identificação do agente etiológico responsável pelo quadro clínico. Utilizando-se nessa tarefa de técnicas de cultivo, isolamento e identificação, complementadas com testes de sensibilidade aos antimicrobianos, que possam ser adotadas como rotina em um laboratório de Microbiologia Clínica.

O estabelecimento de uma rotina bacteriológica torna-se difícil, muitas vezes, pela falta de padronização de técnicas corretas, que permitam concluir, com segurança e rapidez, a identificação dos microrganismos. A existência de inúmeros meios de cultura, das mais diversas origens e com finalidades praticamente idênticas, força o profissional a estabelecer uma rotina bacteriológica que seja ao mesmo tempo eficiente e econômica. A aplicação de um conjunto de procedimentos, de modo prático e objetivo, requer certa experiência em bacteriologia, e além de um estudo sistemático dos principais gêneros e espécies patogênicas, é indispensável considerar alguns aspectos de importância básica na seleção adequada de técnicas laboratoriais.

Controle de esterilidade

Um rigoroso controle de todo o material utilizado no laboratório é um dos procedimentos básicos para seu bom funcionamento, envolvendo desde a limpeza geral de pisos e bancadas, até a criteriosa esterilização de todos os materiais utilizados em contato com meios de cultura e amostras clínicas.

Métodos de coloração

É uma etapa fundamental para a identificação e tem a finalidade de facilitar a observação microscópica das células bacterianas, diferenciando-as de acordo com suas propriedades tintoriais. As bactérias são difíceis de serem observadas em preparações não coradas, e a coloração só é possível em virtude da afinidade de certos grupos ionizáveis do corante com determinados componentes químicos da célula bacteriana. Os métodos de coloração diferencial baseiam-se no

fato de a composição química de muitas bactérias ser variável o suficiente para diferenciá-las, em decorrência da afinidade por determinados tipos de corantes. Os dois procedimentos de coloração mais usados são o método de Gram e o método de Ziehl-Neelsen.

a) **Coloração de Gram:** Em 1884, Hans Christian Gram descobriu que as bactérias podiam ser divididas em dois grandes grupos, partindo da capacidade que têm as células coradas de resistirem ou não a uma descoloração pelo álcool. Isso ocorre pela maior quantidade de lipídios na parede celular das bactérias das células Gram-negativas, quando comparados com as células Gram-positivas.
b) **Coloração de Ziehl-Neelsen:** Algumas bactérias possuem um envoltório de ácidos graxos e lipídios complexos, denominados *ácidos micólicos*, que não fixam os corantes comuns. No entanto, quando essas células são coradas por processo drástico resultante de aquecimento, resistem a uma descoloração com solução de álcool-ácido. Deste modo, são denominadas bactérias álcool-ácido resistentes.

Meios de cultura

A maioria das bactérias pode ser cultivada em laboratório, utilizando-se meios nutrientes. No entanto, diferentes espécies de bactérias variam extensivamente quanto às exigências nutricionais mínimas. De maneira simplificada, podemos definir meio de cultura como um conjunto de substâncias, formuladas de maneira adequada, capazes de promover o crescimento bacteriano, em condições de laboratório. Além da composição química, deverão ser considerados aspectos físicos relativos à temperatura, aeração e tempo, que constituem as principais variáveis que interferem diretamente no crescimento bacteriano.

Classificação dos meios de cultura

Quanto à sua utilização, podem ser classificados da seguinte forma:

a) **Meio de enriquecimento:** são meios líquidos, ricos em nutrientes, permitindo que as bactérias de uma amostra clínica aumentem em número, possibilitando seu melhor isolamento. Pode também possuir propriedades seletivas, conferidas por substâncias inibidoras das espécies, sem importância clínica, que favorecem o crescimento de patógenos. Ex.*: Caldo Brain Heart Infusion (BHI), e Caldo Tetrationato (seletivo).*
b) **Meio de transporte:** é um meio isento de nutrientes, contendo um agente redutor e uma substância com poder de tamponamento, previne a desidratação durante o transporte e evita a oxidação ou a autodestruição enzimática dos patógenos presentes. Ex.: *Meio de Stuart, Meio de Cary-Blair (semisólido).*
c) **Meio seletivo:** é capaz de selecionar as espécies que se deseja isolar, impedindo o desenvolvimento de outros germes através da adição de um componente químico específico, como corantes, antibióticos ou outros inibidores para algumas bactérias. Ex.: *Ágar Manitol Salgado, Ágar SS.*
d) **Meio diferencial:** possibilita distinção entre alguns grupos bacterianos, por possuir em sua composição substâncias que permitem uma diferenciação visual presuntiva, evidenciada por mudança de coloração ou na morfologia das colônias. A maioria dos meios diferenciais é também seletiva, com vários tipos de inibidores de crescimento. Ex.: *Agar Eosin Methilene Blue (EMB), Ágar McConkey (MC) e Ágar Hektoen (HE).*
e) **Meio indicador:** é utilizado no estudo das propriedades bioquímicas das bactérias, através da verificação de reações de fermentação/degradação de certos compostos. Incorporam-se ao meio básico um carboidrato e uma substância indicadora, e a partir da mudança de coloração detecta-se a positividade da reação pela produção de compostos finais de pH e coloração definidas. Ex.: *Agar Triple Sugar Iron (TSI).*

Seleção de meios de cultura

A escolha dos meios para processamento inicial das amostras clínicas provenientes de determinada área do organismo está primariamente condicionada à microbiota, presuntivamente patogênica para esse local. Em geral, é usado mais de um tipo de meio, no sentido de fornecer condições de crescimento a todos os patógenos possíveis de estarem presentes, sendo este fato determinado, via de regra, pela origem das amostras.

Preparo e esterilização de meios de cultura

O procedimento mais utilizado atualmente é a aquisição de meios industrializados e fornecidos de forma desidratada. A técnica consiste apenas na pesagem criteriosa da quantidade necessária ao volume desejado, seguido de dissolução e esterilização, conforme orientação fornecida pelo fabricante e impressa na embalagem. A autoclavação é o método mais eficaz de esterilização dos meios de cultura, utilizando-se a temperatura de 121 ºC e uma atmosfera de pressão durante 15 a 20 minutos.

Outra alternativa, disponível atualmente e cada vez mais utilizada em grandes rotinas, é a aquisição de meios prontos para uso, fornecidos em placas de Petri descartáveis, o que suprime as etapas de preparo e testes preliminares de funcionamento ou esterilidade, assim como diminui a necessidade de ambiente físico para o seu manuseio e estocagem. No entanto, a implantação dessa metodologia deve ser precedida de cuidadosa análise de custos para determinar sua real viabilidade.

Condições de incubação

A principal condição de incubação é a temperatura em que o microrganismo se desenvolve. A temperatura ótima de crescimento da maioria dos patógenos se encontra na faixa entre 35 °C a 37 °C e, além disso, é importante que a atmosfera da estufa contenha alguma umidade. Outro aspecto são as condições de aeração, sendo a incubação de anaeróbios mais difícil e demorada que o cultivo de germes aeróbios ou facultativos. Essa metodologia exige a utilização de jarras especiais em que, através de reações químicas, são geradas as condições de anaerobiose necessárias ao desenvolvimento dos microrganismos. Ex.: *Jarras "Gaspak"*.

■ COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

Um dos fatores mais importantes para um bom resultado do exame microbiológico é a maneira como o material clínico é obtido e encaminhado para exame. Desse modo, o número, os tipos e o significado clínico dos microrganismos isolados são largamente influenciados pelas técnicas usadas para coleta, transporte e processamento primário das amostras.

Requisição

É um formulário padronizado usado no laboratório, que na maioria dos casos é o único contato entre o clínico e o laboratório e, desse modo, deve fornecer informações suficientes para um processamento adequado da amostra, tais como: identificação do paciente: nome, idade, sexo etc., tipo da amostra, técnica de coleta e exame solicitado.

Coleta

O pessoal deve ser devidamente treinado e periodicamente reciclado nessa atividade, conhecendo instruções sobre conservação e transporte do material clínico. Apesar da técnica de coleta variar de acordo com o exame a ser realizado, devem ser obedecidas algumas regras básicas aplicadas às diversas situações.

Processamento inicial

O responsável pela rotina deverá verificar se a amostra está apropriadamente identificada, se a quantidade de material é suficiente, e observar o aspecto da mesma. Uma vez preenchidos os requisitos básicos de aceitabilidade da amostra, é feito o processamento inicial, da seguinte forma:

a) **Exame microscópico após coloração:** é necessária a preparação de um esfregaço para coloração. Os microrganismos serão vistos após coloração, apenas se estiverem presentes em uma concentração de 10^4 a 10^5 bactérias/mL da amostra.
b) **Inoculação e incubação:** precauções de segurança devem ser tomadas com todas as amostras e a transferência de uma amostra para o meio é feita geralmente com alça bacteriológica, podendo as amostras coletadas com "swab" serem semeadas diretamente na superfície do ágar, sobre uma pequena área da superfície, seguido por esgotamento com auxílio da alça.

■ ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Depende da descrição de suas características morfotintoriais, bioquímicas e antigênicas. Como na maioria dos casos, o organismo a ser isolado pertence a uma população mista, e é indispensável seu isolamento em cultura pura.

Método de inoculação por esgotamento

Consiste em espalhar a amostra com o auxílio de uma alça bacteriológica, fazendo estrias sucessivas até o esgotamento do material, obtendo-se um isolamento de colônias das bactérias existentes na amostra.

Exame de características do cultivo

No exame do crescimento bacteriano após cultivo devem ser levadas em consideração várias características:

a) **Pigmentação:** algumas bactérias produzem pigmentos característicos na colônia ou no meio em volta, que oferecem um dado presuntivo na identificação e diferenciação. Ex.: *Pseudomonas aeruginosa (esverdeado) e Serratia marcescens (vermelho)*.
b) **Morfologia e tamanho:** as colônias possuem características morfológicas que auxiliam sua identificação, havendo variação conforme o tipo de meio e confluência do crescimento na superfície do meio. Também sofre variação, de acordo com o tipo de meio, tempo de incubação e, principalmente, densidade de crescimento bacteriano.
c) **Capacidade hemolítica:** deve ser considerada na identificação presuntiva, sendo importante na identificação preliminar e escolha dos testes complementares e diferenciais, principalmente para diferenciação de Estreptococos.
d) **Mudanças nos meios diferenciais:** esses meios possuem corantes, indicadores de pH e outros componentes, que atuam na detecção das atividades enzimáticas e ajudam a diferenciar presuntivamente as colônias presentes. Assim, a partir do exame inicial do crescimento, juntamente com a coloração de Gram das colônias isoladas, serão escolhidas as provas complementares e diferenciais.
e) **Exame das características bioquímicas:** A capacidade de degradação dos substratos específicos pelas bactérias, torna possível a diferenciação presuntiva de muitos gêneros e mesmo espécies bacterianas. O fundamento das reações bioquímicas é a obtenção de um composto final, de pH definido, capaz de alterar um sistema indicador, evidenciando sua positividade. Por outro lado, a base do funcionamento dos aparelhos de automação em microbiologia é a

utilização de microtécnicas bioquímicas, adaptadas a diferentes métodos de leitura, de acordo com o equipamento utilizado.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO

A identificação rápida é definida como aquela realizada no mesmo dia em que as colônias são isoladas. Mas, apesar de diminuírem o tempo de identificação dos patógenos, não oferecem informações acerca do padrão de sensibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos isolados. Os avanços fundamentais em Microbiologia Clínica são medidos por seus impactos práticos no diagnóstico de doenças infecciosas.

A lista de inovações em Microbiologia Diagnóstica é relativamente curta, e considerando-se que um limitado número de organismos é responsável pela maioria das infecções, alguns procedimentos simples, como coloração de Gram, morfologia colonial e testes simples adotados em rotina, tais como: catalase, coagulase e oxidase, podem fornecer uma identificação presuntiva rápida. Além disso, alguns sistemas automatizados têm sido desenvolvidos no sentido de fornecer resultados em um espaço de tempo mais curto, utilizando substratos enzimáticos que fornecem um produto final de coloração definida produzido por enzimas específicas, próprias das bactérias e codificadas geneticamente.

Apesar de ter sido um dos últimos setores a ser automatizado dentro da atividade laboratorial, ultimamente vem se registrando um considerável avanço na área de automação em microbiologia com o surgimento de diversos equipamentos, em geral adaptados para rotinas com grande volume de trabalho que ainda não fazem parte de uma rotina corrente na maioria dos laboratórios clínicos, e são utilizados como fundamento para testes automatizados ou semiautomatizados. Para laboratórios de pequeno e médio portes a aquisição desses equipamentos deve ser precedida de uma análise bastante criteriosa de sua real necessidade, devido aos elevados custos de aquisição, treinamento operacional de pessoal e, principalmente, de manutenção e assistência técnica.

Os dois grandes avanços registrados na área de Microbiologia Diagnóstica foram, respectivamente:

a) **MALDI-TOF (*Matrix assisted laser desorption*):** Foi introduzida há pouco tempo a metodologia de identificação bacteriana conectada à espectrometria de massa **TOF-MS** (***time of flight, mass spectometry***), que durante muitos anos foi utilizada na identificação geral de proteínas. Essa técnica, com finalidade bacteriológica, foi desenvolvida inicialmente na Europa (2009) e permite, a um custo extremamente baixo, a identificação rápida dos diferentes tipos de bactérias. Acima de tudo, o método é fácil de implementar e oferece acurácia acima de 95% dos casos, com elevada concordância com os métodos convencionais e automatizados. Assim, independentemente de algumas limitações técnicas dessa metodologia ainda em evolução, o método tem demonstrado uma revolução positiva nos laboratórios de Microbiologia Clínica.

b) **Métodos moleculares:** São hoje considerados técnicas de rotina em muitos laboratórios, considerando que sua expansão foi acompanhada com o decréscimo dos custos, possibilitando em muitos casos sua adoção como rotina. Os métodos moleculares são usados para finalidades de diagnóstico, epidemiologia ou pesquisa.

c) **Identificação de proteínas e enzimas de resistência:** Em complemento aos tradicionais métodos de determinação da resistência aos antimicrobianos existe agora a possibilidade de obtenção de resultados mais rápidos através da análise do espectro de MALDI-TOF, tornando possível a identificação de proteínas associadas a clones resistentes, ou demonstrando atividade enzimática ligada à resistência antimicrobiana.

CONTROLE DE QUALIDADE

A relação dos parâmetros a serem submetidos ao controle de qualidade em Microbiologia deve abranger desde o setor de lavagem e montagem até a elaboração do laudo final, dependendo do porte do laboratório e do tipo de serviço prestado (*ambulatorial, hospitalar, privado, de rotina, de urgência etc.*).

Esse controle é essencial para fornecer exatidão, segurança e melhor desempenho no isolamento e identificação de microrganismos clinicamente importantes. Além do aspecto técnico propriamente dito, é importante a verificação das instalações físicas e infraestrutura necessária ao adequado funcionamento do setor.

Meios de cultura

a) **Teste de esterilidade:** O procedimento empregado é a incubação de uma parte representativa de cada partida de meio. A presença de crescimento bacteriano indica contaminação ocorrida em alguma etapa durante a preparação.

b) **Aspecto do meio:** Deve ser feito um exame visual da transparência e cor do meio; a presença de turbidez ou precipitado tornam o meio insatisfatório para uso.

c) **Teste de funcionamento:** Deve ser feito para cada nova partida do meio, ou sempre que necessário, utilizando-se amostras bacterianas de culturas padronizadas.

Discos de antibióticos

Discos usados na rotina diária devem ser estocados no refrigerador, em recipientes fechados, contendo um agente desidratante, devendo-se observar criteriosamente as datas de validade. Os discos de antibióticos devem ser testados a cada nova partida, com técnicas padronizadas, utilizando linhagens-padrão de sensibilidade conhecidas (ATCC).

Equipamento

Deve ser estabelecido um programa de manutenção preventiva para assegurar o funcionamento apropriado de todos

os equipamentos. Devem ser testados com mais exatidão os seguintes itens: temperatura das incubadoras, estufa de esterilização, refrigeradores e freezers, além do funcionamento adequado da centrífuga e autoclave. Com esta finalidade são elaborados mapas de controle com prenchimento diário dos dados a serem aferidos.

Amostras-padrão de bactérias

São obtidas em laboratórios de referência ou coleções com padrão conhecido (ATCC), sendo ainda disponíveis comercialmente na forma de conjuntos de reagentes. Essas amostras são possuem características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e sorológicas das espécies representadas, sendo utilizadas para testar a qualidade dos meios, reagentes e procedimentos de laboratório. O aspecto central de um programa de controle de qualidade (CQ) em microbiologia envolve o uso adequado de um conjunto de amostras bacterianas de referência, estabelecendo-se um esquema de aferição para meios, reagentes, discos de antibióticos e equipamentos.

BIOSSEGURANÇA

Na opinião de especialistas que discutem a biossegurança, o grande problema não está nas tecnologias disponíveis para eliminar e minimizar os riscos e, sim, no comportamento dos profissionais. A biossegurança não está apenas relacionada a sistemas modernos de esterilização do ar de um laboratório ou das câmaras de desinfecção das roupas de segurança. Um profissional de saúde que não lava as mãos com a frequência adequada ou que descarta o lixo hospitalar de maneira errada são práticas do dia a dia que também trazem riscos. Por isso, a adoção de normas de biossegurança em laboratórios clínicos é condição fundamental para a segurança dos trabalhadores, qualquer que seja a área de atuação, pois os riscos estão sempre presentes, porém é importante que o profissional da área procure fazer treinamentos e ter acesso às informações que podem contribuir de forma decisiva para a melhoria das condições da própria segurança, livrando-o dos riscos desnecessários.

Normas de segurança

Recentemente foram incorporados consideráveis avanços nos trabalhos de laboratórios de ensino, pesquisa e prestação de serviços especializados. A introdução de diversos aparelhos analíticos, assim como alguns procedimentos avançados nas rotinas dos laboratórios, determinaram cuidados mais criteriosos e expressiva preocupação com os níveis de segurança nessas rotinas de trabalho. Considerando-se a natureza dos serviços prestados pelo setor de microbiologia, muitos riscos lhe são inerentes e objeto de preocupação em relação ao pessoal envolvido.

É indispensável, portanto, que todos sejam adequadamente instruídos para evitar ou minimizar tais riscos. No laboratório de microbiologia, assim como em outras áreas, a segurança é de responsabilidade da direção ou da supervisão de cada setor, no sentido de evitar ao máximo riscos aos seus funcionários e técnicos. Por outro lado, é atribuição de cada funcionário o uso dos equipamentos de proteção individual (EPI) e a execução de suas tarefas dentro dos parâmetros de segurança, devendo ser estabelecidas as regras genéricas e os Procedimentos Operacionais Padrão (POPs). Protocolos que descrevem detalhadamente cada atividade realizada no laboratório, desde a coleta até a emissão de resultado final, incluindo utilização de equipamentos, procedimentos técnicos, cuidados de biossegurança e condutas a serem adotadas em acidentes.

Medidas gerais de prevenção

- Adoção de manuais de procedimentos adequados e de primeiros socorros, acompanhados de orientação verbal, quando necessário.
- Localização adequada para equipamentos de segurança, em lugar visível e de fácil acesso, incluindo extintores de incêndio, que devem ser vistoriados regularmente.
- Recomendação sobre o uso de bata ou avental para proteção da pele e das roupas.
- Recomendação para lavar as mãos frequentemente, pelo menos ao fim de cada jornada de trabalho, prender os cabelos e não usar anéis e pulseiras.
- Adoção de cuidados especiais na pipetagem, utilizando pipetas automáticas ou munidas de pera, no manuseio de material contaminado.
- Emprego da autoclave para material biológico, placas e tubos de cultura, antes de serem descartados como lixo, ou encaminhados para lavagem e montagem.
- Desinfecção, com hipoclorito a 1% ou álcool a 70%, das bancadas e outras superfícies de trabalho, no início e ao final da jornada de trabalho.
- Preferência de utilização, sempre que possível, de material descartável (seringas, luvas, toalhas etc.). Antes do uso das luvas as atividades devem ser programadas, para evitar contaminação de outras áreas ou equipamentos, considerando que luvas contaminadas disseminam microrganismos.

Cuidados relativos a riscos de contaminação

É difícil quantificar o risco no trabalho em laboratórios, com relação aos agentes infecciosos. Tem-se por base que o risco individual aumenta com a frequência e com os níveis de contato com o agente infeccioso. O primeiro cuidado a ser tomado no laboratório que trabalha com amostras bacterianas é contra o risco de exposição à infecção. Por outro lado, deve-se considerar que os riscos são influenciados por uma relação variável entre o agente infectante, o hospedeiro e a atividade desempenhada.

Fatores aplicáveis ao agente incluem virulência, carga infectante e toxigenicidade. As variantes relacionadas ao indivíduo e que influem no risco podem incluir idade, sexo, gravidez, uso de antimicrobianos e imunidade, incluindo vacinação prévia. O vírus da hepatite (HBV) e o *Mycobacterium*

tuberculosis estão entre entre os agentes mais importantes associados com infecção adquirida no laboratório. A vacinação contra HBV está disponível e é altamente recomendável para indivíduos que trabalham com sangue ou fluidos biológicos potencialmente contaminados. Na prevenção de tuberculose é feita a triagem anual com PPD, seguida de raios X, utilizando-se antibiótico profilático para indivíduos reagentes.

Finalmente, a natureza da atividade laboratorial (*diagnóstico/pesquisa*) pode afetar significativamente o risco pessoal devido ao tipo, à quantidade e à concentração dos agentes empregados, à manipulação dos agentes potencialmente infecciosos e à eficácia primária e secundária dos equipamentos de proteção e práticas de laboratório. Deste modo, é importante considerar todas as amostras examinadas como sendo potencialmente infecciosas.

Existem várias portas de entrada de microrganismos. No laboratório a via respiratória tem maior importância. Três fatores principais contribuem para isso: a facilidade com que partículas pequenas são produzidas por técnicas rotineiras, o fato de muitas dessas partículas não serem capturadas por mecanismos de defesa do trato respiratório, e a habilidade que grande parte dos patógenos tem de invadir o pulmão.

Medidas básicas de proteção

Lavagem das mãos

A contaminação pode ser reduzida pela combinação de lavagem criteriosa e uso de luvas. No entanto, fazendo-se ou não o uso de luvas, deve-se lavar as mãos sempre que houver mudança de atividade ou saída do laboratório. A lavagem deve envolver mãos e antebraços, usando-se água e sabão líquido. Outra opção é o uso de solução degermante à base de polivinil-pirrolidona-iodo (PVPI) a 1%, ou outra solução com finalidade semelhante. Recomenda-se a secagem com o uso de toalhas descartáveis, evitando possível recontaminação.

Uso de luvas

O uso de luvas é obrigatório, sempre que houver a possibilidade de contaminação ou durante o manuseio com material contaminado, corrosivo ou tóxico, utilizando os diferentes tipos de acordo com a finalidade da trabalho.

a) **Luva plástica:** como é descartável, deve ser desprezada após cada uso. É indicada para proteção exclusiva do usuário em situações de coleta de material, recebimento ou entrega de material biológico, triagem etc.
b) **Luva doméstica:** pode ser antiderrapante e não é descartável. Seu uso está indicado para lavagem e desinfecção de materiais e superfícies. Após o uso lavar as mãos enluvadas com água e sabão, descontaminando-se, e, posteriormente, as luvas em solução de hipoclorito a 0,5% durante 30 a 60 minutos.
c) **Luva de procedimento (látex):** não é estéril, sendo descartável e utilizada na proteção aos usuários contra contaminação durante a execução de suas tarefas. Em laboratório, em geral, utiliza-se um par de luvas para cada jornada de trabalho.
d) **Luva de couro (camurça):** não é descartável. É indicada para proteção exclusiva do usuário contra lesões traumáticas ou perfurantes, utilizada em tarefas grosseiras como recolhimento de lixo, transporte de material corrosivo etc.

Uso de máscaras, protetores oculares e aventais

Máscaras e protetores oculares constituem EPI e são utilizados para evitar a exposição das mucosas da boca e dos olhos, impedindo o risco de inalação nos procedimentos que possam produzir aerossóis. Os aventais não devem ser confundidos com uniformes, e são usados na rotina diária de trabalho, como proteção ao corpo e vestuário, devendo ser de mangas longas e confeccionados em tecido apropriado à sua finalidade.

Eliminação de resíduos

O lixo do laboratório é considerado contaminado e deve ser esterilizado antes da liberação. Vidrarias, em geral, incluindo pipetas, placas de Petri e outros itens reaproveitáveis deverão sofrer descontaminação, com o emprego da autoclave, antes de serem encaminhados para lavagem. Existem sacos plásticos autoclaváveis utilizados na esterilização dos materiais descartáveis antes de serem desprezados, e é importante ressaltar que o lixo laboratorial deve ser rotulado e recolhido dentro das normas adotadas para lixo hospitalar.

INTERPRETAÇÃO E VALIDAÇÃO DE TESTES LABORATORIAIS

Uma das funções do supervisor do Laboratório de Microbiologia é selecionar ou decidir os tipos de testes ou procedimentos a serem adotados como rotina de serviço e incluídos nos manuais de bancada. Esses métodos devem ser validados com base nas características de acurácia, precisão, sensibilidade, especificidade e valor preditivo. No entanto, para entender e analisar quantitativamente a *performance* dos vários métodos, algumas definições básicas são requeridas.

a) **Validação:** Documentação de que um teste tem sido verificado repetidamente, dando os resultados esperados dentro de determinado período de tempo. Desse modo, confirma-se que o teste é satisfatório de acordo com as necessidades do laboratório. Esse processo envolve: competência do pessoal, controle de qualidade (interno/externo) e correlação com achados clínicos.
b) **Verificação:** Exame do teste ou sistema de diagnóstico para determinar se o mesmo atende às especificações estipuladas pelo fabricante. Analisando-se a sensibilidade, especificidade, valor preditivo, reprodutibilidade e acurácia.
c) **Precisão:** Reprodutibilidade de um teste quando o mesmo é repetido muitas vezes. Pode ser aferido

dentro do laboratório ou em diferentes laboratórios, e não implica em acurácia ou eficiência.

d) **Acurácia (eficiência):** Capacidade de um teste atingir o padrão-ouro *(gold standard),* isto é, a percentagem de resultados corretamente identificados pelo método, determinando-se como verdadeiramente positivos ou negativos. A correta interpretação dos testes laboratoriais depende do conhecimento de suas características e limitações. Nenhum teste laboratorial é perfeito, isto é, capaz de detectar determinada doença em todas as circunstâncias em que a mesma possa se manifestar. Um teste diagnóstico é dito válido quando o seu resultado se aproxima da realidade, e quando não há fonte de erro sistemática.

A capacidade de um teste de laboratório discriminar pacientes com ou sem doença é uma função da sensibilidade e especificidade do teste. Desse modo, o valor preditivo de um procedimento ou análise é a probabilidade de um paciente, com teste positivo, ter determinada doença, estando esse valor correlacionado diretamente com os fatores citados.

Evidentemente, os dados aqui referidos nem sempre são passíveis de definição numérica confiável, pois muitas vezes o diagnóstico definitivo nunca é atingido, por não existir um padrão-ouro, ou quando este é impraticável. No entanto, as definições apresentadas devem servir de parâmetro de referência para o julgamento de um teste diagnóstico e de cada resultado em particular, servindo como base para avaliações de custo-benefício e valorização de um resultado obtido.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas - Gestão da Qualidade no Laboratório Clínico - NBR 14500 - jun 2000.
2. Alados JC, Alcaraz MJ, Aller AI, et al. Diseño de um Laboratório de Microbiologia Clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28(7):453-60.
3. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 50, de 21 de fevereiro de 2002. Dispõe sobre o regulamento técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde. Brasília, 2002. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br
4. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 33, de 25 de fevereiro de 2003. Dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Brasília, 2003. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br
5. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia. 4.ed. Brasília, 2000. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/pub22.htm
6. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 2010;23:550-76.
7. Carvalhaes CG, Cayô R, Assis DM, et al. Detection of SPM-1--Producing Pseudomonas aeruginosa and Class D β-Lactamase-Producing Acinetobacter baumannii Isolates by Use of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol. 2013;51(1):287-90.
8. Cornaglia G, Raoult D. Clinical Microbiology: a future based on tradition. In: Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, et al. European Manual of Clinical Microbiology. 1.ed. Societé Française de Microbiologie/European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2011.
9. De Bruyne K, Slabbinck B, Waegeman W, et al. Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. Syst Appl Microbiol. 2011;34:20-9.
10. Matttews S, Deutekrom J. The future of diagnostic bacteriology. Clin Microbiol Infect. 2011;17:651-4.
11. Miller JM, Holmes HJ, Krisher K. Specimen collection and handling. In: Murray, PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al. Manual of Clinical Microbiology. 8.ed. Washington: ASM. Press, 2003. p.55-66.
12. Schaumann R, Knoop N, Genzel GH, et al. Discrimination of Enterobacteriaceae and Non-fermenting Gram Negative Bacilli by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Open Microbiol Jour. 2013;7:118-22.
13. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix--assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis. 2009;49:543-51.
14. Seng P, Rolain JM, Fournier PE, et al. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. Future Microbiol. 2010;5:1733-54.
15. Woods GL, Washington JA. The clinician and the microbiology laboratory. In: Mandell, GL, Bennett JE, Dolin R. 4.ed. New York: Churchill Livingstone, 1995. p.169-99.

30

capítulo

Cássia Maria Zoccoli ▪ Daniane Grando Remor Canali ▪ Nina Reiko Tobouti

Gestão da Qualidade e Biossegurança em Laboratórios de Microbiologia Clínica

INTRODUÇÃO

A qualidade é um termo intrínseco ao laboratório clínico e deve fazer parte das rotinas de trabalho, além de elemento integrante de treinamento, da disseminação de políticas, processos e ações de melhoria.

O sistema de gestão da qualidade (SGQ) trata de um conjunto de diretrizes e princípios relacionados à qualidade aplicados no dia a dia do laboratório com a finalidade de padronizar os seus processos, visando não somente a atingir a satisfação dos clientes resolvendo problemas detectados, mas também promovendo melhorias onde não existem problemas.

Um SGQ inicial em laboratório de microbiologia deve contemplar políticas e programas de qualidade para que se possa monitorar e avaliar as principais etapas das análises laboratoriais, fases pré-analítica, analítica e pós-analítica, avaliando-as de forma contínua e sistemática (também chamadas fases pré-exame, exame e pós-exame) (Figura 30.1).

Algumas das principais razões que levam à sua implantação e monitoramento são: aumento da taxa de satisfação dos clientes (médicos, pacientes, laboratórios parceiros e prestadoras de serviços), melhoria da imagem e desempenho do setor, aumento da produtividade e redução de custos, melhoria da comunicação, satisfação e segurança dos colaboradores, maior competitividade e oportunidade de mercado.

Com as ferramentas que o SGQ oferece é possível que o setor implante, gerencie e verifique periodicamente a qualidade de seus processos, permitindo a organização e o monitoramento dos mesmos, e diminuindo a probabilidade de erros nas análises. Uma dessas ferramentas gerenciais é conhecida como Ciclo PDCA, sigla da expressão em inglês: *"Plan-Do-Check-Action"* (Planejar-Fazer-Checar-Agir).

O bom desempenho do laboratório de microbiologia depende, portanto, de um programa efetivo documentado (Programa de Gestão da Qualidade em Microbiologia) e disseminado para garantir exatidão, fidelidade e reprodutibilidade das informações fornecidas. As diretrizes básicas de um programa de gestão da qualidade incluem:

1. Responsabilidade da direção.
2. Gestão das fases pré-analítica, analítica e pós-analítica.

Figura 30.1 Fluxo de trabalho e fases dos processos analíticos.
Fonte: Adaptada de CLSI GP38-A, 2012.

3. Garantia da qualidade, incluindo a gestão do controle interno da qualidade (CIQ), controle externo da qualidade (CEQ), controle alternativo (CAQ), e verificações/validações de metodologias e equipamentos.
4. Controle de documentos e registros.
5. Gestão de equipamentos e insumos.
6. Capacitação de colaboradores.
7. Gestão das ações corretivas e preventivas, com foco no cliente e no produto.
8. Biossegurança.
9. Gestão de risco e segurança do paciente.

DIRETRIZES DO PROGRAMA DE GESTÃO DA QUALIDADE

Responsabilidade da direção

A direção do laboratório e seus responsáveis designados formalmente devem representar a base sólida de um programa de gestão da qualidade. Esse grupo de pessoas deve ter as seguintes competências:

- Definir, implementar e disseminar políticas.
- Planejar e disponibilizar recursos humanos, financeiros e tecnológicos suficientes, assim como instalações físicas adequadas para o andamento das operações.
- Realizar análises periódicas do sistema implantado, incluindo todos os itens relacionados neste capítulo, com base em indicadores estratégicos, com metas definidas, seguindo as boas práticas e legislações que envolvem um laboratório de análises clínicas. Os principais indicadores são aqueles que refletem as atividades críticas para o resultado final, que afetam diretamente os pacientes ou que tenham sido fonte de problemas no passado (Quadro 30.1).
- Garantir a rastreabilidade de todas as etapas dos processos.

O exemplo que deve ser "de cima para baixo", aliado aos recursos disponibilizados, torna possível a realização do produto, que compreende todas as atividades relacionadas às análises microbiológicas.

Gestão das fases pré-analítica, analítica e pós-analítica

Fase pré-analítica

A interpretação, o cadastro correto no sistema do laboratório da requisição médica e das informações relacionadas ao paciente e à amostra biológica, principalmente para amostras processadas no setor de microbiologia, são requisitos essenciais de qualidade em laboratório.

O laboratório é responsável por disponibilizar um manual de exames, revisado periodicamente e acessível para todos os colaboradores, contendo informações, tais como:

- Critérios para preparo e instruções ao paciente, tipo de frascos e conservantes para cada amostra biológica.
- Coleta, formas de conservação, estabilidade e transporte das amostras.
- Critérios para aceitabilidade das amostras tais como: volume, viabilidade celular, por exemplo, amostra de escarro (avaliar a quantidade de leucócitos e células epiteliais).
- Critérios para rejeição das amostras, por exemplo, de urina de 24 horas para cultura de micobactérias, duas culturas de urina para urocultura coletadas no mesmo dia, utilização de frascos incorretos ou não identificação, armazenamento ou transporte inadequado, e contaminação da amostra durante a coleta.

A rastreabilidade, o registro de todas as informações relacionadas às amostras colhidas, tais como: data, horário, responsável pela coleta e eventuais intercorrências durante sua realização são fundamentais, sendo que essas informações devem estar disponíveis para consulta em todas as etapas do exame microbiológico.

A identificação correta e completa das amostras desde a coleta até o recebimento pelo setor de microbiologia é de extrema importância para evitar erro do laboratório e garantir resultados confiáveis à segurança do paciente.

O recebimento e tratamento das amostras antes do envio para análise no laboratório de microbiologia também faz parte da fase pré-analítica, principalmente nos laboratórios que possuem postos de coleta distantes da área técnica. Alguns processamentos iniciais podem ser realizados nas unidades de coleta, como semeadura de urina em meios específicos.

A qualidade das análises microbiológicas está diretamente relacionada à qualidade dos processos pré-analíticos, onde encontramos o maior percentual de erro (entre 68% a 70%).

Fase analítica

Apesar de todo avanço tecnológico, a microbiologia ainda é um setor que depende de julgamentos interpretativos e, portanto, profissionais especializados, com experiência comprovada de pelo menos dois a cinco anos, dependendo da atividade. As variáveis analíticas de um exame microbiológico devem ser muito bem controladas para assegurar resultados confiáveis (garantia da qualidade/controle de qualidade).

A fase analítica tem início com a análise das amostras recebidas, interpretação e conferência do resultado.

Em microbiologia os resultados dos exames parciais ou definitivos são particularmente descritivos. Durante as análises, uma revisão deve ser realizada, antes da conferência final, avaliando-se o conjunto dos dados clínicos fornecidos pelo médico solicitante, medicamentos em uso, resultados de exames relacionados, e histórico do paciente. Levar em consideração a implantação de um sistema para a detecção de resultados anormais ou inaceitáveis, como um mecanismo de barreira, por exemplo, *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina – fenótipo ainda raro de resistência; *Klebsiella pneumoniae* sensível à ampicilina – microrganismo apresenta resistência intrínseca ao antimicrobiano, portanto reportar como resistente.

A notificação de resultados críticos e de doenças de notificação compulsória é outro processo que deve estar amplamente disseminado na microbiologia. É fundamental definir

uma política e manter registros que identifiquem essas comunicações. O formulário para registro da notificação de resultados críticos deve conter os seguintes campos: data e hora da ciência do resultado crítico, número do protocolo ou identificação do paciente, colaborador responsável pela comunicação, o resultado crítico propriamente dito, respon-

Quadro 30.1 Indicadores da qualidade (fases pré-analítica e analítica).

Tipo de indicador	Processo	Objetivo	Indicador	Análise realizada
Pré-analítico	Hemocultura	Monitorar o processo de coleta – procedimento de antissepsia	Número de frascos contaminados/ número de frascos coletados × 100. Meta: inferior a 3%.	Determinar % de contaminação. Exemplo de prováveis contaminantes: *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., culturas com mais de 2 microrganismos. Classificar em conjunto com a Comissão de Infecção Hospitalar os microrganismos contaminantes, sempre que possível. Revisar procedimentos e treinamentos se resultados acima da meta.
Pré-analítico	Cultura de urina	Monitorar o processo da coleta	Número de culturas de urina contaminadas/ número de culturas de urina realizadas × 100. Meta: inferior a 5%.	Determinar % de contaminação, em decorrência da coleta, de amostras para cultura de urina. Exemplo: avaliar culturas com 3 ou mais microrganismos, independentemente do número de leucócitos na sedimentoscopia.
Analítico	Culturas para micobactérias	Monitorar o processo de isolamento em cultura	Número de culturas positivas para micobactérias/número total de culturas para micobactérias × 100.	Determinar a positividade das culturas e realizar análise semestral/ anual de acompanhamento. Em geral, o laboratório tem uma positividade homogênea se não mudar o perfil de pacientes.
Analítico	Laudos retificados	Monitorar o processo técnico e a competência dos analistas	Número de laudos retificados/número total de laudos liberados × 100.	Classificar os erros em 2 grupos. Erros que afetam o cliente/paciente (que foram liberados e notificados pelo médico ou paciente), e erros que foram detectados antes da liberação do laudo para o médico ou paciente (*near miss*).
Analítico	Prazo de entrega de resultados	Monitorar todo o processo técnico	Número de exames liberados com atraso/ número total de exames liberados × 100.	Verificar processos internos que podem levar ao atraso. Ajustar os parâmetros das metodologias.
Analítico	Micobacteriologia	Monitorar o processo de cultura e pesquisa de micobactéria	Verificar % de concordância entre a microscopia e a cultura.	Analisar a % de concordância entre o resultado da microscopia e cultura. O processo pode estar inviabilizando o crescimento de micobactérias ou não estão sendo observadas micobactérias na microscopia.

Fonte: Adaptado de Oplustil *et al.*,2010.

sável pelo recebimento (nome e sobrenome), data e hora do comunicado do resultado crítico. No final do processo o colaborador responsável pela comunicação deve garantir que o responsável pelo recebimento do resultado crítico entendeu a informação, utilizando a ferramenta do *read-back* (certificar-se de que o receptor entendeu corretamente a informação sobre o resultado passado). Registrar em detalhes o sucesso ou não da comunicação.

Exemplos de valores considerados críticos em microbiologia:

- Hemocultura positiva.
- Microscopia pelo método de Gram de líquidos corporais, líquor, aspirados de abscessos e biópsias.
- Cultura positiva de materiais oftálmicos tais como raspados de córnea e humor vítreo.
- Pesquisa direta de fungos em materiais com suspeita clínica de micose sistêmica (líquidos orgânicos e biópsias).
- Pesquisa e cultura positivas para bacilo álcool ácido-resistente de qualquer amostra biológica.
- Isolamento de bactérias multirresistentes.
- Isolamento de bactérias anaeróbias: *Fusobacterium necrophorum*, *Clostridium perfringens* em feridas e secreções cirúrgicas e *Clostridium septicum*.
- Pesquisa e cultura de *Neisseria* spp. (patogênica) em material genital ou outros.
- Cultura de fezes positiva para *Salmonela* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* e/ou *Yersinea* spp.

Fase pós-analítica

Fase que inicia com a transmissão dos resultados já validados para emissão dos laudos. O laboratório deve fornecer nos laudos, quando necessário, informações adicionais úteis para a interpretação do exame, limites de referência, sensibilidade, especificidade, valor preditivo, interferentes entre outros, incluindo as referências bibliográficas das informações.

Nos testes em que são utilizados *kits* comerciais para realizar o diagnóstico direto de um agente etiológico, a Anvisa tem como norma citar no laudo informações relativas ao *kit*, tais como: lote, fabricante, valores de referência, sensibilidade e especificidade.

É de responsabilidade do laboratório manter as amostras já analisadas, armazenadas num período de tempo suficiente para permitir repetição ou revisão de testes já processados anteriormente ou acrescentar novos testes a critério clínico, desde que as amostras estejam viáveis (Quadro 30.2).

A assessoria técnico-científica é parte integrante do pós-exame e possui papel fundamental nas atividades de comunicação e esclarecimento de dúvidas dos clientes internos e externos, e de consultoria para novos produtos e serviços.

GARANTIA DA QUALIDADE

Controle Interno da Qualidade (CIQ)

O controle interno da qualidade em microbiologia compreende o controle de insumos e das metodologias utilizados nos processos diários. Esses insumos devem ser testados com cepas conhecidas, como as fornecidas pela *American Type Culture*

Quadro 30.2 Sugestão de tempo de armazenamento de algumas amostras biológicas depois do processamento.

Tipo de amostra	Período de armazenamento
Líquor, líquidos orgânicos*	72h
Amostras coletadas com "*swab*" em meio de transporte*	24h
Alíquotas de urina de jato médio*	48h
Fezes em *Cary-Blair**	48h
Escarro (cultura geral)*	48h
Amostras para cultura de micobactérias*	10 dias
Lâminas coradas para pesquisa de micobactérias	6 meses
Culturas positivas para micobactérias	6 meses (mínimo)
Lâminas de Gram de amostras biológicas diversas	7 dias
Frascos de hemoculturas positivas	30 dias
Frascos de hemoculturas positivas para micobactérias	30 dias
Placas ou tubos de culturas positivas	10 dias

* Amostras devem armazenadas refrigeradas de 2°C a 8°C.

Fonte: Adaptado de Oplustil *et al.*, 2010.

Collection (ATCC). Outras cepas de referência que podem ser utilizadas são as cepas isoladas na rotina, muito bem caracterizadas (> 95% de acerto/probabilidade) ou as recebidas dos ensaios de proficiência do controle externo da qualidade (CEQ).

Para o CIQ do Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA), dos cartões e painéis utilizados em sistemas automatizados para identificação e TSA, utilizar somente cepas ATCC, conforme recomendação do fabricante, já que devem apresentar perfil fenotípico de reações bioquímicas e de sensibilidade padronizados.

O resultado do CIQ deve ser avaliado antes das análises das amostras dos pacientes. O controle tem como objetivo validar os insumos e avaliar o desempenho dos testes e provas bioquímicas para uso na rotina, garantindo a qualidade da metodologia utilizada (Quadros 30.3 e 30.4).

É parte integrante do CIQ a realização de ensaios de amostras cegas entre os colaboradores para microscopia, por exemplo, da coloração de Gram, padronizando a leitura e a interpretação dos achados entre eles.

Os exames que eventualmente são realizados em dois equipamentos também podem ser monitorados semestralmente, por meio de estudos comparativos entre eles, utilizando amostras de pacientes e/ou cepas de referência.

Todas as etapas do CIQ devem ser registradas em formulários apropriados. É de responsabilidade do gestor da microbiologia, ou colaborador por ele designado, supervisionar mensalmente todos os resultados de controle interno e, se necessário, tomar as ações corretivas.

Mais informações sobre o CIQ consultar capítulo específico nesta publicação.

Controle Externo da Qualidade (CEQ)

Todos os testes processados no setor de microbiologia devem ser monitorados periodicamente por amostras de provedores externos, chamadas ensaios de proficiência. Esse programa serve para monitorar e avaliar objetiva e sistematicamente a qualidade dos resultados liberados.

Para os testes cujas amostras de ensaios de proficiência não estão disponíveis, é necessário implantar um programa de controle alternativo da qualidade (CAQ) utilizando recursos como comparações interlaboratoriais, controle duplo-cego com materiais conhecidos, estudo de correlação clínica e de exames adicionais, análise de amostras da bacterioteca. A periodicidade da realização do CAQ deve ser definida pelo laboratório, e conforme a demanda dos mesmos.

Atualmente o mercado de laboratório conta com alguns programas nacionais e internacionais que podem ser utilizados. Dentre os nacionais podemos citar Controlab e PNCQ (Programa Nacional de Controle de Qualidade) da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. Entre os internacionais mais frequentemente adotados no Brasil podemos citar o CAP (*College of American Pathologists*).

Os resultados dos controles externos e alternativos devem ser analisados assim que estiverem disponíveis. As ações corretivas, quando necessárias, devem ser abertas em formulários apropriados para avaliação das causas dos erros. Uma boa ação corretiva do controle externo da qualidade deve conter, no mínimo, uma investigação inicial, estudo de causa raiz, avaliação das amostras de pacientes liberadas na época em que o erro ocorreu, ações corretivas rápidas e eficácia das ações tomadas. É de responsabilidade do gestor do setor de microbiologia avaliar e aceitar o conteúdo das análises críticas do CEQ.

Verificações e validações

Definição de verificação e validação conforme descritas no Cumitech 31A – *Verification and Validation of Procedure in the Clinical Microbiology Laboratory*.

- **Verificação:** consiste num único procedimento de confirmação ou determinação das características do

Quadro 30.3 Controle de qualidade de testes/insumos FO-285-1.

Teste/ Insumo	Fabricante	Lote	Validade	Microrganismo testado	Resultado esperado	Resultado obtido	Data/ técnico	Data/ técnico
Oxidase	XXXXX	34dt4	23/10/14	*E. coli* *P. aeruginosa*	Negativo (-) Positivo (+)	- +	12/3/14	13/3/14
Catalase	WWW	234211	25/7/15	*S. aureus* *S. pyogenes*	Positivo (+) Negativo (-)	+ -	12/3/14	13/3/14
Indol	ZZZZ	Ffa31	20/12/14	*P. aeruginosa* *E. coli*	Negativo (-) Positivo (+)	- +	12/3/14	13/3/14
PYR	YYYY	23856	10/1/15	*S. agalactiae* *S. pyogenes*	Negativo (-) Positivo (+)	- +	10/3/14	17/3/14

Fonte: Adaptado de Oplustil *et al.*, 2010.

Quadro 30.4 Sugestão para o Controle Interno da Qualidade de reagentes e provas bioquímicas.

Teste	Frequência	Microrganismo e resultado esperado
CAMP teste	A cada dia de uso	Positivo (+): *S. agalactiae* Negativo (-): *S. pyogenes*
DNase	A cada dia de uso	Positivo (+): *S. aureus* Negativo (-): *S. epidermidis*
Hipurato	A cada dia de uso	Positivo (+): *S. agalactiae* Negativo (-): *S. pyogenes*
Teste da betalactamase (cefinase)	A cada novo lote e nova remessa	Positivo (+): *S. aureus* Negativo (-): *H. influenzae* ATCC 10211
Oxidase	A cada novo lote e nova remessa	Positivo (+): *P. aeruginosa* Negativo (-): *E. coli*
Coagulase	A cada novo lote e nova remessa	Positivo (+): *S. aureus* Negativo (-): *S. epidermidis*
Indol	A cada novo lote e nova remessa	Positivo (+): *E. coli* Negativo (-): *P. aeruginosa*
Catalase	A cada novo lote e nova remessa	Positivo (+): *S. aureus* Negativo (-): *S. pyogenes*
Disco de novabiocina (NV 5 μg)	A cada novo lote e nova remessa	≤ 15 mm: *S. saprophitycus* ≥ 16 mm: *S. epidermidis*
Disco de optoquina	A cada novo lote e nova remessa	≥ 16 mm: *S. pneumoniae* Sem halo de inibição: *S. faecalis*
PYR (L-pyrrolidonyl-β-naphtylamide)	A cada novo lote e nova remessa	Positivo (+): *S.pyogenes* Negativo (-): *S. agalactiae*

Fonte: Acervo das autoras

teste quanto à sensibilidade, especificidade e, quando apropriado, valor preditivo positivo e negativo, precisão e acurácia do método, antes de ser implementado na rotina laboratorial.

- **Validação:** procedimento que confirma que o teste continua operando satisfatoriamente de acordo com os critérios preestabelecidos. A validação é parte integrante do programa de garantia da qualidade, por exemplo, a avaliação de competência dos colaboradores envolvidos no processo e os controles internos e externos da qualidade.

As verificações permitem correlacionar o desempenho de um "Teste" com o desempenho de um "Comparativo" para definir se o primeiro (teste) gera, com determinado grau de confiança, resultados equivalentes àqueles do método utilizado para comparação. As verificações ocorrem sempre no momento da implantação de novos sistemas, métodos ou testes.

Quando implantamos métodos produzidos "*in house*" ou não avaliados anteriormente pelo fabricante, utilizamos o conceito da validação, que é o procedimento que fornece evidências de que um sistema apresenta desempenho dentro das especificações da qualidade de maneira a fornecer resultados válidos.

Para as verificações qualitativas e semiquantitativas que não são consideradas padrão-ouro, a concordância deverá ser avaliada. As outras especificações analíticas podem ser adquiridas e verificadas por meio de informações fornecidas pelo fabricante, como testes de sensibilidade e especificidade, e valor preditivo.

O laboratório deve manter os registros de especificações de desempenho do método, enquanto o método está em uso, e pelo menos por cinco anos após a descontinuação do mesmo.

Sugere-se consultar o documento de referência Cumitech 31A e o documento da Anvisa- Microbiologia Clínica

para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (módulo II).

CONTROLE DE DOCUMENTOS E REGISTRO

O controle de documento aplica-se a todas as políticas definidas, procedimentos e registros em formulários. O laboratório deve ter um sistema de gestão ou controle de documentos para assegurar:

- que todas as cópias de políticas e procedimentos estão atualizadas;
- que os colaboradores estão familiarizados com políticas/procedimentos pertinentes às suas atividades de trabalho;
- que todas as políticas/procedimentos são revisadas periodicamente (anual) e aprovadas pelo diretor do laboratório ou gestor por ele designado antes da implementação. Todos os colaboradores devem ser treinados em novas políticas e procedimentos que possuem impacto para o produto do laboratório;
- que quando qualquer documento da qualidade torna-se obsoleto deve ser mantido disponível em arquivos separados, durante pelo menos cinco anos.

O laboratório deve adotar uma política de controle e revisão de documentos da qualidade. Manuais eletrônicos são totalmente aceitáveis. Não há nenhuma exigência que cópias em papel estejam disponíveis. O laboratório deve disponibilizar a documentação no ambiente de trabalho, de fácil acesso, eletronicamente ou em formato físico.

As atividades de um processo do setor de microbiologia devem estar descritas na forma de procedimento (por exemplo, POP - Procedimento Operacional Padrão) e os registros dessas atividades devem ser realizados em formulários.

Os procedimentos analíticos devem conter no mínimo: a finalidade e o princípio do método, aplicação clínica, padrões, controles, reativos e outros insumos, equipamentos, passo a passo para realização do teste, definição do CIQ e CEQ, fluxogramas, cálculos, interferentes e reações cruzadas, valores de referência e valores críticos quando aplicáveis, linearidade, limite de detecção e limitações do método, interpretação do teste, referências bibliográficas, critérios de liberação de resultados e ações de segurança dos colaboradores.

GESTÃO DE EQUIPAMENTOS E INSUMOS

O laboratório deve implantar e manter equipamentos de análise e insumos que atendam à demanda de testes realizados na rotina, sendo que estes devem possuir registros prévios na Anvisa.

Equipamentos

O SGQ deve contemplar um programa documentado de monitoramento periódico de todos os equipamentos utilizados no setor de microbiologia, incluindo manutenção preventiva, corretiva, calibrações e verificação de desempenho. Todas as manutenções realizadas nos equipamentos devem ser registradas em formulários próprios, de acordo com a periodicidade e as especificações do fabricante. Os manuais desses equipamentos devem estar disponíveis na área técnica e consultados sempre que necessário. Os registros de desempenho dos equipamentos devem ser armazenados durante toda a vida útil do equipamento.

As temperaturas de geladeiras, freezers, banhos-maria, ambiente, incubadoras devem ser definidas conforme a necessidade dos itens armazenados e registradas diariamente. Elaborar procedimentos e registros de higienização periódica da superfície de trabalho, de cabines de segurança biológica, geladeiras e freezers, banhos-maria e centrífugas.

Meios de cultura

Entende-se por insumos em microbiologia: reagentes, *kits,* meios de cultura (fabricados pelo laboratório ou comprados prontos para uso), disco de antimicrobianos, sorologias, painéis ou cartões de sistemas automatizados, entre outros. Para os laboratórios que fabricam meios de cultura há necessidade de elaborar um manual de preparo descrevendo em detalhes o processo e o controle de qualidade dos mesmos. Registrar a quantidade de meios de cultura preparado, número do lote, aditivos, data do preparo, pH, validade e técnico responsável pela preparação. É essencial realizar teste de esterilidade e desempenho dos meios preparados no laboratório utilizando cepas de referência. Documentar todos os resultados em formulários apropriados.

Para os meios de cultura adquiridos comercialmente, apesar dos certificados de qualidade que os acompanham, há necessidade de realizar uma inspeção no recebimento. Os itens que devem ser avaliados são: data do recebimento, nome do meio, lote, validade, quantidade. Inspecionar por amostragem placas quebradas ou rachadas, espessura do meio, presença de contaminação, ressecamento, bolhas, hemólise, descolamento do ágar e presença de água de condensação.

Alguns meios comerciais que devem ser testados pelo laboratório independentemente do certificado de qualidade do fabricante, são: meios de cultura para *Campylobacter*, ágar-chocolate, ágar Thayer-Martin, entre outros. (CLSI M22-A3 *Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media).*

Corantes e reagentes

O rótulo de cada corante ou reagente deve conter, no mínimo, nome, concentração, condições de estocagem, data do preparo, quando foi colocado em uso e prazo de validade, sendo que a estocagem do mesmo deverá ser realizada conforme as recomendações do fabricante. O controle de qualidade dos reagentes e corantes preparados no laboratório pode ser testado utilizando controles positivos e negativos.

Novos lotes e novas remesas de *kits*, antissoros, discos de antibióticos devem ser testados, conforme recomendação do fabricante, e em paralelo com o lote anterior ou com cepas de referência antes de serem colocados em uso. Os resultados dos testes devem ser documentados em formulários apropriados.

CAPACITAÇÃO DE COLABORADORES

O laboratório deve ter um organograma, políticas de pessoal, e as descrições das funções que definam as qualificações e os deveres para todos os cargos (analistas, técnicos, auxiliares etc.). Arquivos de pessoal devem conter qualificações, incluindo cópias de diplomas/transcrições, licenças (quando necessário), avaliações de desempenho, registros de educação continuada e registros de saúde, incluindo **teste para cores de Ishihara (**teste para detecção do daltonismo). O teste de discriminação de cores é importante para o pessoal que realiza ensaios que exigem avaliação por meio de cores.

O bom andamento das atividades do laboratório dependerá da qualidade das informações fornecidas aos colaboradores. Com esse objetivo é essencial que o laboratório disponibilize um código de ética e conduta, e que periodicamente defina com cada colaborador quais são suas metas dentro de determinado período de tempo. Essas metas podem ser para capacitação técnica ou comportamentais.

Os colaboradores devem ser capacitados, utilizando um plano de treinamento adequado desde sua admissão no laboratório, devendo ser qualificados para o volume e a complexidade do trabalho. A capacitação de cada colaborador deve estar registrada em um documento de matriz de responsabilidade.

Para assegurar a exatidão dos processos realizados no setor de microbiologia, os colaboradores devem ter sua competência avaliada sempre após novos treinamentos (avaliação da competência inicial), anualmente, e quando detectadas não conformidades relacionadas ao desempenho.

GESTÃO DAS AÇÕES CORRETIVAS E PREVENTIVAS

O laboratório deve definir uma política para registrar as ocorrências, tomando ações corretivas de não conformidades, quando necessário, e não abrindo mão de registrar ações preventivas para evitar problemas futuros.

Para adquirir a cultura de registrar os eventos não conformes, o apoio dos superiores é fundamental. O gestor do setor de microbiologia precisa receber cada não conformidade como uma oportunidade de melhoria, estudar a causa raiz do problema utilizando as ferramentas da qualidade disponíveis e aplicáveis (diagrama de causa e efeito, ferramenta dos cinco porquês ou outras), e tomar as ações necessárias com base nos resultados da causa raiz estudada inicialmente. Após a conclusão das ações corretivas, a não conformidade deve permanecer sob avaliação até que a eficácia das ações seja compravada na prática.

Para criar a cultura de registro de não conformidade o setor deve:

- Entender o processo e não tratar a não conformidade com ações punitivas, e, sim, de oportunidade de melhoria.
- Implantar melhorias em processos relacionados aos resultados e à segurança do paciente.
- Promover estímulos educacionais.
- Melhorar a autoestima dos colaboradores estimulando uma boa comunicação.

As ações de prevenção são utilizadas para eliminar ou minimizar possíveis não conformidades. Culturalmente, os laboratórios realizam inúmeras ações preventivas, mas não têm o hábito de registrá-las. Exemplos de ações preventivas no setor de microbiologia:

Disponibilizar aos médicos das unidades hospitalares um sistema automatizado de entrega de laudos preliminares e/ou definitivos.

- Dois colaboradores diferentes para digitar e conferir os resultados.
- *Flags* no momento da conferência dos resultados, alertando possíveis erros.
- Avaliação dos resultados anteriores durante as análises das amostras e conferência de resultados.
- Correlacionar exames de mesma amostra biológica, por exemplo, cultura de urina e sedimentoscopia ou microscopia pelo Gram.
- Correlacionar o resultado da microscopia com crescimento na cultura.

Quando descrevemos sobre ações corretivas, não podemos deixar de lembrar que todas as reclamações de clientes que chegam ao laboratório pelos canais: telefone, e-mail, site, redes sociais, e pessoalmente devem ser registradas e tratadas. O laboratório deve estar preparado para dar um retorno adequado às reclamações, dentro de um prazo preestabelecido, e estas devem ser utilizadas também como fonte de melhoria. Periodicamente, o setor deve avaliar as reclamações recebidas de forma crítica (pode-se definir indicadores e metas), envolvendo seus colaboradores.

BIOSSEGURANÇA

O grande risco para os colaboradores que trabalham em laboratório de microbiologia está associado à manipulação de amostras contaminadas e microrganismos isolados dessas amostras. O reconhecimento de novos agentes infecciosos, a emergência da resistência microbiana, novos métodos de diagnóstico e tratamento, além de potenciais agentes de bioterrorismo, reforçaram o interesse em melhorar a segurança no laboratório de microbiologia. É de responsabilidade da direção do laboratório dispor de condições adequadas de segurança para eliminar ou reduzir a exposição dos colaboradores e do meio ambiente ao perigo potencial dos diversos agentes infecciosos.

O principal objetivo de um programa de biossegurança é a contenção de agentes biológicos potencialmente infecciosos. O propósito da "contenção" é reduzir ou eliminar a exposição dos colaboradores, de outras pessoas e do ambiente externo a agentes potencialmente perigosos. Basicamente, existem três mecanismos de contenção, que incluem técnicas e práticas de laboratório, equipamentos de segurança e instalações do laboratório.

Técnicas e práticas de laboratório

Cada laboratório deve desenvolver seu próprio manual de segurança (segurança química básica, biossegurança, prevenção de incêndios, uso de equipamentos de proteção, risco elétrico, limpeza e desinfecção de áreas e equipamentos), identificando os perigos a serem encontrados e especificando as práticas e os procedimentos adequados para minimizar ou eliminar os riscos de contaminação. Os colaboradores devem ser treinados para reconhecer os perigos e praticar as Boas Práticas em Laboratório Clínico (BPLC's) e as Normas de Biossegurança (NR-32 Ministério do Trabalho e Emprego).

É de responsabilidade da direção do laboratório a implantação de:

- Programa de Prevenção de Risco Ambiental (PPRA) avaliado anualmente (NR-32).
- Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO) – exame pré-admissional e periódico (clínico e laboratorial) – anual.
- Programa de vacinação atualizado.
- Registro de doenças e acidentes de trabalho.
- Boas Práticas em Laboratório Clínico (BPLC's).
- Acesso limitado ao laboratório.

A segurança aos colaboradores é dada por meio de rotinas de trabalho, com a utilização de técnicas microbiológicas adequadas, do uso apropriado de equipamentos de proteção coletiva (EPC) e equipamentos de proteção individual (EPI), da vigilância da saúde dos colaboradores e da organização do ambiente de trabalho.

A proteção ambiental à exposição de materiais infectados é realizada pela combinação da prática operacional e do projeto das instalações do laboratório.

Boas práticas em laboratório clínico (BPLC's)

- Proibido comer, beber, fumar, guardar alimentos e aplicar cosméticos na área técnica.
- Cabelos longos devem estar sempre presos durante a jornada de trabalho.
- Evitar o uso de adornos como joias, bijuterias e outros adereços.
- Quando são usados crachás presos com cordão em volta do pescoço, estes devem estar sob o jaleco.
- É vedado o uso de calçados abertos (chinelos e sandálias).
- Toda amostra biológica deve ser considerada potencialmente contaminada.
- É obrigatório uso de EPI's.
- Proibido pipetar com a boca. Utilizar pipetas automáticas.
- É obrigatória a descontaminação das bancadas de trabalho antes e após o desenvolvimento das atividades.
- Proibido reencapar e entortar agulhas após o uso.
- Descartar material perfurocortante em recipiente apropriado.
- Material contaminado deve ser descontaminado antes do descarte.
- Determinar áreas limpas e contaminadas.
- Os equipamentos devem ser descontaminados antes de ser transportados.
- Manter organizadas todas as áreas de trabalho.
- Não estocar grandes quantidades de itens contaminados em áreas de trabalho (ex.: placas com crescimento bacteriano).
- Tirar o jaleco quando sair do setor e colocá-lo em local apropriado. Higienizar corretamente as mãos.
- Não manipular materiais não identificados.
- Segregar e acondicionar adequadamente resíduos biológicos, químicos e ionizantes.
- Depositar todo material contaminado utilizado nas análises microbiológicas em recipientes apropriados para autoclavação prévia, antes do descarte final.
- Lavar as mãos e/ou a superfície da pele imediatamente após contato com amostra biológica, após remover luvas e ao completar qualquer atividade.
- Sempre ter em mente que toda superfície, tanto de trabalho quanto de recipientes pode ter sido contaminada inadvertidamente. O manuseio das amostras deve ser feito com cuidado para prevenir eventual acidente ou produção de aerossóis. Utilizar luvas sempre que necessário.

Equipamentos de segurança

Os equipamentos de segurança incluem equipamentos de proteção coletiva (EPC) como cabine de segurança biológica, combinada com o uso de EPI (luvas, jalecos, gorros, pró-pés, máscara, óculos ou viseira de proteção) (Quadro 30.5).

- Equipamento de Proteção Individual (EPI) - todo dispositivo ou produto de uso individual pelo colaborador, destinado à proteção de riscos capazes de ameaçar a segurança e a saúde no trabalho (NR5 MTE). Compete ao profissional usá-los e conservá-los. Avental, luvas, Kevlar®, máscara, óculos de proteção, protetor facial e sapatos.
- Equipamento de Proteção Coletiva (EPC) - cabine de segurança biológica, lava-olhos, chuveiro de segurança, autoclave, incinerador, equipamentos de combate a incêndios e *kit* para derramamento de produtos químicos.

Cabine de segurança biológica

É o principal equipamento de contenção de respingos ou aerossóis gerados pelos procedimentos microbiológicos. Existem três tipos de cabine de segurança biológica (classes I, II e III).

- **Cabine de segurança biológica classe I:** é uma cabine em que o fluxo de ar ocorre de fora para dentro, pela abertura frontal, sobre a superfície de trabalho. Os aerossóis eventualmente gerados pela manipulação do material são carregados pelo fluxo de ar para o duto de exaustão. No final do duto de exaustão existe um filtro HEPA (*high efficiency particulate air*) e o ar é liberado para

Quadro 30.5 Equipamentos de proteção e níveis de segurança de laboratório.

Atividades	Equipamentos de proteção	Nível de segurança
Processamento inicial das amostras biológicas	Luvas, jaleco, cabine de segurança biológica	2
Subcultivo de hemoculturas	Luvas, jaleco, cabine de segurança, óculos ou viseira de proteção	2
Subcultivo de colônias ou de meios em caldo	Jaleco, óculos ou viseira de proteção e luvas	2
Identificação e antibiograma (manual ou automatizado)	Jaleco, óculos ou viseira de proteção e luvas	2
Manipulação de culturas com crescimento de micobactérias e fungos	Luvas, jaleco, máscara, cabine de segurança e centrífuga com caçapa protegida	3

Fonte: Acervo das autoras

o interior do laboratório. Essas cabines protegem o operador e o ambiente externo à cabine, mas não o material que está sendo manipulado, e podem ser usadas quando se trabalha com microrganismos de baixo ou moderado risco.

- **Cabine de segurança biológica classe II:** é uma cabine com abertura frontal, na qual uma parte do ar é recirculado. Esse tipo de cabine protege o operador, o produto e o meio ambiente.
  - **Cabine tipo A1:** na qual o ar ambiente entra pela abertura frontal, 70% é recirculado para o interior da cabine, passando por um filtro HEPA e 30% é exaurido para o interior do laboratório, passando por outro filtro HEPA. Esse tipo de cabine não pode ser utilizado para trabalhos com substâncias químicas voláteis, radioativas ou tóxicas.
  - **Cabine tipo B1:** tem 30% de recirculação do ar e 70% é exaurido passando por um filtro HEPA e dutada para o exterior do laboratório. Essa cabine pode ser utilizada com substâncias químicas de baixa volatilidade e protege também a amostra que está sendo manipulada.
  - **Cabine tipo B2:** tem 100% de exaustão, sem recirculação do ar, protegendo o operador, o material manipulado e o ambiente. É indicada para a manipulação de radioisótopos e vapores, e é indicada para trabalho com culturas de micobactérias. Esse tipo de cabine deve ser dutado para fora do prédio.
- **Cabine de segurança biológica classe III:** é uma cabine hermeticamente fechada, impermeável a gases, e todo o trabalho é realizado com luvas de borracha que estão presas à câmara. Oferece o mais alto grau de proteção ao operador e ao meio ambiente. O ar que entra passa por um filtro HEPA e o ar que sai pelo exaustor passa por dois filtros HEPA dispostos sequencialmente. Todos os equipamentos necessários (centrífuga, incubadora etc.) devem estar dentro da cabine. É indicada para o trabalho com microrganismos de alto poder infectante, em laboratórios nível 4.

Dicas para o bom uso da cabine de segurança biológica:

- As cabines devem estar localizadas em local de pouco tráfego e distantes de portas. Devem ser instaladas em local apropriado para melhor uso do equipamento.
- Evitar colocar equipamentos e materiais a menos de 11 cm da abertura frontal da cabine para não obstruir o fluxo de ar necessário para o bom funcionamento do equipamento.
- Não utilizar bico de Bunsen no interior da cabine, pois o calor emanado pode distorcer o fluxo de ar e provocar danos aos filtros. A melhor opção é utilizar alças descartáveis ou incinerador elétrico. Não bloquear as grelhas de entrada e saída de ar com papéis.
- A luz ultravioleta (UV) é considerada item dispensável, mas instalada na grande maioria das CSB. A luz UV, se instalada, deve ser limpa semanalmente para que sujidade e poeira não bloqueiem a atividade germicida. A intensidade da luz UV deve ser verificada quando a cabine é certificada, a fim de assegurar que a emissão de luz está apropriada. Não expor os olhos e pele à luz UV.
- Ao ligar a cabine, limpar a superfície de trabalho do equipamento com álcool 70% e deixar a cabine e a luz UV, ao menos 10 a 15 minutos em funcionamento, antes de iniciar a rotina de trabalho. Fazer o mesmo processo depois da desinfecção diária e antes de desligá-la.
- Desligar a luz UV quando a cabine estiver sendo utilizada, no intuito de proteger olhos e pele.
- Evitar ligar e desligar muitas vezes a cabine durante o período de trabalho.

- Se o laboratório funciona 24 horas, não desligar a cabine, a não ser que apresente malfuncionamento.
- Evitar perturbar o fluxo de ar com movimentos de entrada e retirada de materiais e das mãos. Aguardar 1 minuto após a introdução dos braços do operador na cabine antes de iniciar o trabalho, para que o fluxo de ar no interior da cabine se estabilize. Se tiver que introduzir e retirar os braços da cabine várias vezes, os movimentos devem ser lentos e cuidadosos.
- Trocar os filtros de acordo com as especificações do fabricante e das avaliações nas certificações semestrais. A certificação e troca de filtros deve ser realizada por profissionais especializados.

Instalações do laboratório

O projeto das instalações do laboratório de microbiologia é uma importante barreira de proteção para os colaboradores que exercem suas atividades fora ou dentro da área de trabalho. A área física do laboratório deve ser planejada de acordo com os agentes a serem manipulados (Quadro 30.6).

Níveis de biossegurança

Existem quatro níveis de segurança classificados conforme a atividade e o microrganismo de maior risco envolvido no trabalho segundo a RDC/Anvisa nº 50, o CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) e o NIH (*National Health of Institute)* (Quadro 30.7).

Quadro 30.6 Classes de riscos dos agentes biológicos.

Classe de risco	Risco individual	Risco para comunidade	Infectividade
1	Baixo	Baixo	Nenhum risco ou baixa probabilidade de infectar homem e animais.
2	Moderado	Baixo	Pode causar infecções humana ou animal. Existem medidas eficazes terapêuticas ou profiláticas. Risco limitado de propagação da infecção.
3	Elevado	Moderado	Pode causar infecções graves ao homem e em animais, podendo infectar outras pessoas. Existem medidas terapêuticas e/ou profilaxia
4	Elevado	Elevado	Grande ameaça para humanos e animais. Altamente patogênicos e de grande poder de transmissibilidade de uma pessoa para outra, direta ou indiretamente, não existindo medidas terapêuticas ou profiláticas.

Fonte: Adaptado da referência 1.

Quadro 30.7 Níveis de segurança recomendados para agentes infecciosos.

Nível (NB)	Classificação do agente	Agente	Condutas	Barreiras primárias e EPI	Instalações
1	Pouca probabilidade de causar doenças em adultos sadios	*Bacillus subtilis, Lactobacillus casei.* Protozoários de vida livre	Boas práticas em laboratório clínico (BPLC's)	Barreiras primárias: não requerida. EPI: Jaleco e luvas. Óculos e viseira de proteção, quando necessário	Bancada aberta e pia
2	Agentes associados a doenças em humanos	Microrganismos causadores de infecções	Condutas do NB-1, acrescido de: • Acesso limitado • Sinalização de risco biológico	Barreiras Primárias: Cabine de segurança (classe I ou II), usada para manipulações de materiais que possam causar respingos ou aerossóis.	NB-1 acrescido de: • autoclave disponível

(*Continua*)

Quadro 30.7 Níveis de segurança recomendados para agentes infecciosos. (*Continuação*)

Nível (NB)	Classificação do agente	Agente	Condutas	Barreiras primárias e EPI	Instalações
2	Transmissão: lesão cutânea, ingestão, exposição de mucosa	Exemplos: *Salmonella, Shigella,* vírus da hepatite B, HIV, *Toxoplasma* spp. *Staphylococcus aureus,* entre outros	• Cuidados com perfurocortantes • Normas para descontaminação e de descarte de resíduos • Procedimento de Biossegurança disponível e de fácil acesso	EPI: Jaleco, luvas óculos e viseiras de proteção, quando necessário	
3	Agentes associados a doenças graves ou potencialmente letais Transmissão: aerossóis	Todos os agentes mencionados no NB-2 e *Mycobacterium tuberculosis, Brucella* spp. *Coxiella burnetii, Bacillus anthracis, Histoplasma*	Condutas do NB-2, acrescido de: • Acesso controlado Descontaminação de todo o resíduo (ex.: autoclavação) • Descontaminação do vestuário antes da lavagem, se não for descartável	Barreiras primárias: • CSB Classe II, dutada para área externa. • EPI: Jaleco adicional (descartável), luvas, óculos, viseiras de proteção e máscara de proteção N95, quando necessário	NB-2, acrescido de: • Sistema de exaustão controlado e exclusivo de pressão negativa sem recirculação do ar • Dupla porta de acesso com fechamento automático • Separação física de corredor de acesso • Pia para lavagem das mãos próxima à saída do laboratório
4	Associados a agentes com alto risco de causar lesão letal Agentes com relação antigênica próxima aos agentes da classe de risco biológico 4 até que se defina o nível de biossegurança Transmissão: aerossóis ou risco de transmissão desconhecida	Arenavirus (Lassa, Junin, Machupo), Filovirus (Ebola), entre outros	Condutas do NB-3, acrescido de: • Troca de roupa na entrada • Tomar banho na saída • Descontaminação de todo material antes de sair do laboratório	Barreiras primárias: CSB Classe III ou Classes I ou II com uso de trajes pressurizados positivamente	NB-3, acrescido de: • Laboratório separado de outras unidades laboratoriais ou em área isolada • Instalação do laboratório (exaustão, fornecimento de ar, vácuo e descontaminação)

Fonte: Adaptado de Oplustil *et al.*, 2010.

TRANSPORTE DE AMOSTRA

O transporte das amostras infecciosas deve ocorrer de acordo com os regulamentos nacionais e internacionais.

O cumprimento das regras tem o objetivo de:

- Reduzir a probabilidade de danos e vazamentos.
- Reduzir exposição resultando em possíveis infecções.
- Melhorar a eficiência da entrega.

Recomendações:

- O acondicionamento deve suportar manipulações bruscas e conter material líquido sem que ocorra vazamento para o lado de fora.
- Rotulagem adequada das embalagens com o símbolo de "risco biológico" e outro rótulo que alerte sobre o conteúdo perigoso da embalagem.
- Documentação sobre o conteúdo da embalagem contendo informações necessárias para caso de situação de emergência.
- Verificar se os frascos estão bem vedados.
- As amostras devem estar devidamente identificadas.
- Utilizar maletas ou caixas rígidas com tampas higienizáveis.
- Utilizar uma segunda bandeja, plástica ou inox, carrinho, recipientes à prova de vazamento para transportar internamente no laboratório.

Limpeza de superfícies

Uma das atividades mais importantes para manter a área física e os equipamentos em condições adequadas é a limpeza geral do laboratório. A limpeza inclui o cuidado com as superfícies e com o resíduo gerado dentro do laboratório.

A ação do desinfetante depende da natureza do material derramado, da superfície a ser descontaminada, do número de microrganismos presentes, e da resistência dos mesmos ao efeito do germicida. Materiais com alta concentração de proteínas (sangue e soro) podem inativar o desinfetante.

As soluções desinfetantes mais utilizadas para desinfecção de superfícies (bancadas) de trabalho são: hipoclorito de sódio 0,1% a 0,5% ou álcool etílico a 70% (V/V) (Quadro 30.8 e Tabela 30.1).

Quadro 30.8 Procedimentos e produtos utilizados para descontaminação de artigos e superfícies do laboratório.

Descontaminante	Procedimento/ Concentração	Tempo de contato	Atividade contra	Características importantes	Aplicação
Autoclave: 15psi Autoclave 27psi	Vapor saturado 121 °C Vapor saturado 132 °C	50-90 min 10-20 min	• Bactérias • Micobactérias • Esporos • Fungos • Vírus	Riscos de queimadura se operado inadequadamente	• Resíduos • infectantes • Líquidos • Vidrarias
Incinerador elétrico de bancada	Aquecimento 600-900 °C	Mínimo de 5 s e máximo de 30 s	• Bactérias • Micobactérias • Esporos • Fungos	Riscos de queimadura	• Alças e fios bacteriológicos
Quaternário de amônio	0,1%-2%	10-30 min	• Bactérias (V) • Fungos (V) • Vírus lipofílicos (ex.: HIV, HBV)	• Tóxico se absorvido ou ingerido • Inativado por material orgânico	• Pisos, mobiliários e paredes
Fenóis	0,2%-5%	10-30 min	• Bactérias • Micobactérias • Fungos • Vírus hidrofílicos (V) • Vírus lipofílicos	• Efeito residual • Corrosivo • Efeito irritante de pele e olhos • Tóxico se absorvido ou ingerido	Descontaminação ambiental de bancadas, pisos e superfícies contaminados com material infectante

(*Continua*)

Quadro 30.8 Procedimentos e produtos utilizados para descontaminação de artigos e superfícies do laboratório. (*Continuação*)

Descontaminante	Procedimento/ Concentração	Tempo de contato	Atividade contra	Características importantes	Aplicação
Cloro e compostos clorados	0,1%-2% (1.000 a 20.000 ppm)	10-30 min	• Bactérias • Micobactérias • Fungos • Esporos (V) • Vírus	• Inativados por matéria orgânica • Efeito residual • Corrosivos • Efeito irritante de pele, olhos e • trato respiratório • Tóxico se absorvido ou ingerido	Descontaminação ambiental de bancadas, pisos e superfícies contaminados com material infectante
Álcool etílico	70%-85%	10-30 min	• Bactérias • Micobactérias • Fungos • Vírus hidrofílicos (V) • Vírus lipofílicos	• Inativado por matéria orgânica • Efeito irritante de pele • Efeito irritante de olhos • Tóxico se absorvido ou ingerido	• Superfícies de equipamentos • Antissepsia de pele

V = poder germicida variável.

Fonte: Oplustil *et al.*, 2010.

Tabela 30.1 Diluição para utilização da água sanitária comercial (solução aquosa de hipoclorito de sódio).

Volume de água sanitária	Volume de água (mL)	Diluição*	% Cloro livre	Tempo de exposição (minutos)	Utilização
Pura* (volume desejado)	0	–	2% 20.000 ppm	–	Altamente corrosivo para metais • Utilizar em frasco afunilado para desprezar material líquido contaminado
1 mL	1	1/2	1% 10.000 ppm	10 a 20	Alto poder de descontaminação • para superfícies porosas ou sobre material biológico derramado
1 mL	19	1/20	0,1% (1.000 ppm)	10	Médio poder de descontaminação • para superfícies (bancadas de trabalho) sem material biológico derramado

** Todas as diluições devem ser preparadas semanalmente com água de torneira para prevenir a perda da ação germicida durante a estocagem ou para pronto uso.

** Geralmente as águas sanitárias nacionais apresentam 2% de cloro livre.

Fonte: Oplustil *et al.*, 2010.

Orientações para descontaminação em caso de acidente

Derramamento de material biológico

- Isolar a área e não entrar na sala por pelo menos 30 minutos.
  - Usar luvas e jaleco (EPI's).
- Colocar sobre o sangue, fluido ou material contaminado papel absorvente (ex.: papel-toalha).
- Saturar o papel-toalha com hipoclorito de sódio a 0,5% a 1% por 10 minutos.
- Remover os resíduos e descartá-los em caixa apropriada ou saco autoclavável (polietileno de alta densidade).

- Fazer nova descontaminação da área com hipoclorito de sódio de 0,5% a 1%.
- Todo material utilizado na limpeza deverá ser descartado em local apropriado (fragmentos de vidro e outros materiais cortantes).

Quebra de tubos com material biológico na centrífuga

- Desligar a centrífuga e mantê-la fechada por 30 minutos para dispersão dos aerossóis.
- Usar EPI's.
- Com o auxílio de uma pinça, recolher os estilhaços e descartá-los em caixa apropriada.
- Limpar as caçapas, os pinos e o rotor com solução germicida apropriada. Não usar hipoclorito de sódio em metais para não haver corrosão.
- Limpar internamente a centrífuga com gaze embebida com solução germicida e após com pano embebido em água e sabão.
- Descartar o material usado na descontaminação em recipiente com saco autoclavável.

Derramamento de produto químico

- Utilizar EPI's.
- Conter o líquido derramado em área reduzida.
- Cobrir com vermiculina ou areia e aguardar sua absorção.
- Recolher todo o resíduo e o material utilizado para limpar a área em saco plástico preto para posterior descarte.

Biossegurança em micobacteriologia

A decisão sobre quais medidas de biossegurança são as mais adequadas para um laboratório de micobacteriologia deve ser baseada nas avaliações de risco dos diferentes tipos de procedimentos que são realizados pelo laboratório (Quadro 30.9 e 30.10).

Quadro 30.9 Fatores a serem considerados para determinar o grau de risco para medidas de precaução para diferentes níveis de laboratório de micobacteriologia.

Fatores que variam de acordo com os procedimentos realizados pelo laboratório	Procedimento		
	Pesquisa direta (microscopia)	Processamento de cultura	Manipulação de culturas e ATB
Risco relativo (95% CI) do trabalhador do laboratório adquirir TB no laboratório, comparado com um não trabalhador do laboratório.	1,4 (0,2-10,0)	7,8 (1,7-34,9)	22 (4,5-102,5)
Carga de BAAR na amostra manipulada	Variável	Variável	Alta: $>10^8$/mL
Viabilidade do BAAR	Incerto, mas assumir como alta	Processamento pode matar 90% dos BAAR	Alta
Probabilidade de as manipulações gerarem aerossóis	Baixa	Moderada	Alta

CI = intervalo de confiança; ATB = antibiograma; BAAR = bacilo álcool-ácido resistente.

Fonte: Traduzido do Manual do *WHO's Guidelines Review Committee - Tuberculosis Laboratory Biosafety*. Manual, 2012.

Quadro 30.10 Nível de risco associado a atividades do laboratório e avaliação de risco em um laboratório de micobacteriologia.

Nível de risco	Atividade do laboratório	Avaliação do risco
Baixo	Microscopia direta do escarro. Preparo da amostra para amplificação de ácido nucleico (Xpert MTB/RIF).	Baixo risco de a amostra gerar aerossol; baixa concentração de partículas infecciosas.
Moderado	Processamento e concentração da amostra para inoculação em meios de cultura primários e teste direto na amostra de sensibilidade a drogas.	Risco moderado da amostra em gerar aerossol; baixa concentração de partículas infecciosas.
Alto	Manipulação de cultura para identificação. Teste de sensibilidade a drogas em isolados de cultura.	Alto risco de a amostra gerar aerossóis; alta concentração de partículas infecciosas.

Fonte: Traduzido e modificado do Manual do *WHO's Guidelines Review Committee - Tuberculosis Laboratory Biosafety.* Manual, 2012.

As avaliações de risco requerem um julgamento cuidadoso. Se por um lado podemos subestimar os riscos que oferecem alta periculosidade, assim também podemos supervalorizar os riscos desnecessariamente, impondo encargos desnecessários, tanto financeiros quanto em recursos humanos.

Em uma avaliação de risco de adquirir tuberculose (TB) devemos considerar:

- a carga bacteriana dos materiais (amostras de escarro e culturas bacterianas), e a viabilidade do bacilo da tuberculose;
- via de transmissão da tuberculose;
- a capacidade da amostra ou do procedimento gerar aerossóis;
- o volume de trabalho do laboratório;
- a epidemiologia da doença;
- o nível de experiência e competência dos técnicos do laboratório;
- a saúde dos técnicos do laboratório (especialmente HIV-positivos).

Para garantir a segurança em um laboratório de micobacteriologia, o resultado da avaliação de risco é quem vai ditar quais os equipamentos laboratoriais, EPI's e recursos do projeto das instalações deverão ser implantados para cada procedimento.

Área física

As micobactérias são microrganismos que acarretam elevado risco individual – risco nível 3, principalmente na identificação e manipulação de micobactérias após crescimento em meio líquido ou sólido.

- Todo trabalho com micobactéria deve ser idealmente realizado em área reservada, contendo todos os suprimentos e equipamentos necessários para o processamento das amostras.
- Somente os laboratórios equipados com cabine de segurança biológica Classes II e III poderão realizar cultura para micobactérias.
- A sala deve ter um sistema de ventilação não recirculante e permanecer fechada durante a manipulação com micobactéria.
- O padrão adequado de ventilação de um laboratório de micobacteriologia ainda não está bem estabelecido internacionalmente. A recomendação do Manual do *WHO's Guidelines Review Committee - Tuberculosis Laboratory Biosafety.* Manual, 2012, é de um fluxo de ar direcional com 6 a 12 trocas de ar por hora.
- O sistema de ar de um laboratório NB-3 deve ter pressão negativa e ser independente, com ventilação unidirecional e com sistema de exaustão, não permitindo a recirculação para outras áreas do prédio. Deve ser exaurido através de filtro HEPA. As portas devem possuir sistema de intertravamento automático e possuir uma antessala (entrada por duas portas).

Segurança

- Conforme a Anvisa - Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção relacionada à Assistência à Saúde, Módulo 7: Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica e *WHO's Guidelines Review Committee - Tuberculosis Laboratory Biosafety* Manual**,** 2012, a manipulação das amostras de escarro para o exame direto (sem concentração e liquefação) pode ser realizada em cabine de segurança biológica Classe II, ou em bancada forrada com papel absorvente, atrás de uma chama de bico de Bunsen, observando sempre a ventilação da área onde a amostra está sendo manipulada. A probabilidade de o escarro gerar aerossóis é muito baixa devido à sua viscosidade.
- Ao fazer uso de bancada aberta, observar que essa área deve ser separada da área de recebimento de amostras e afastada da área administrativa, onde há papéis e telefones.
- A manipulação deve ser feita de modo que o contato entre o colaborador e a amostra seja mínimo. Não permitir a circulação de pessoas para evitar o deslocamento de ar durante o uso da CSB.
- Utilizar os equipamentos de proteção (EPI) - luvas, respirador, jalecos sem abertura na frente e de mangas longas.
- Utilizar pipetas, tubos cônicos com tampa de rosca (preferencialmente de 50 mL), centrífuga com caçapa protegida para evitar aerossóis e alças descartáveis.
- Para evitar respingos, não preencher o tubo totalmente.
- O sobrenadante após digestão e descontaminação deverá ser desprezado em frascos afunilados contendo hipoclorito de sódio a 2% de cloro livre.
- Limpar a superfície de trabalho e a cabine de segurança com desinfetante antes e depois do trabalho.
- Quando as mãos se contaminarem, lavar com álcool a 70% e, em seguida, com água e sabão.

Procedimento em caso de acidente fora da cabine de segurança biológica

- Considerar sempre um evento grave derramamentos de material líquido, suspensão bacteriana (principalmente envolvendo agentes de risco nível 3) ou quebra de tubos durante a centrifugação. Esse tipo de acidente gerará aerossóis potencialmente infecciosos, por isso todos devem desocupar imediatamente o local do acidente.
- O gerente de laboratório deve ser informado do incidente imediatamente, e impedir a entrada de pessoas no local do acidente por pelo menos 1 hora para permitir que os aerossóis sejam removidos através do sistema de exaustão do laboratório e para que as partículas mais pesadas se assentem.
- Sinalizar a área para que seja impedida a entrada no local do acidente.
- Entrar no local do acidente fazendo uso dos EPI apropriados (luvas, jaleco, máscara tipo N95).

- Cobrir o derramamento com papel absorvente e aplicar um desinfetante apropriado, de forma concêntrica, começando pelo lado externo em direção ao centro.
- Deixar agir por tempo determinado pelo tipo de material derramado e desinfetante utilizado (Quadro 30.8 e Tabela 30.1).
- Recolher os tubos quebrados com auxílio de uma pinça ou pá e colocá-los em um recipiente adequado para posterior autoclavação.
- Fazer nova desinfecção, se necessária, e lavar com água para remover odores.
- O colaborador que foi exposto ao acidente deve passar por uma avaliação médica e uma notificação do acidente deve ser realizada.

Procedimento em caso de acidente dentro da cabine de segurança biológica

- Iniciar a limpeza imediatamente após o acidente.
- Deixar a cabine de segurança biológica ligada, a fim de conter os aerossóis. Colocar papel absorvente sobre a área do acidente e aplicar um desinfetante apropriado. Se houver espirros nas paredes da cabine, desinfetar com papel absorvente generosamente embebido com uma solução desinfetante apropriada. Deixar agir durante pelo menos 30 minutos.
- Recolher os tubos quebrados com auxílio de uma pinça ou pá e colocá-los em um recipiente adequado para posterior autoclavação.
- Descontaminar o local e as superfícies com solução desinfetante.

Procedimento em caso de acidente na centrífuga

- Desligar e manter a centrífuga fechada por pelo menos 30 minutos para que os aerossóis assentem.
- Remover as caçapas fechadas e descarregá-las dentro da cabine de segurança biológica.
- Se houver quebra dos tubos durante a centrifugação, descartá-los em recipiente resistente a perfuração.
- Descontaminar as caçapas mergulhando-as em solução desinfetante apropriada, não utilizar hipoclorito de sódio para desinfetar peças de metal, pois pode haver corrosão e danificar o equipamento.

Descarte de resíduos

O laboratório deve ter um plano de tratamento e descarte de resíduos que deve seguir as normas da RDC-306/04 ou aquela que venha a substituir esta e deve ser compatível com as normas locais relativas à coleta, ao transporte e descarte final destes. A RDC Anvisa nº 306/04 e Resolução Conama nº 358/05 definem procedimentos para o gerenciamento de resíduos de saúde.

Todas as culturas positivas para micobactéria devem ser autoclavadas antes do descarte.

Os materiais contaminados devem ser colocados em sacos próprios para autoclave com a identificação de infectante, dentro de recipientes à prova de vazamentos.

Após a autoclavação o material deve ser colocado em recipientes adequados para coleta, seguindo a política do laboratório para retirada desse tipo de resíduo.

É muito importante monitorar rotineiramente (semanalmente) a autoclave com indicadores biológicos. Esses indicadores devem ser colocados no centro da autoclave, preferencialmente dentro de um saco que está sendo autoclavado. O indicador biológico utilizado contém esporos de *Bacillus steatrothermophilus,* que podem vir impregnados em fitas ou em flaconetes.

O ciclo rotineiramente empregado é o de 30 minutos, a 121 °C.

GESTÃO DE RISCO E SEGURANÇA DO PACIENTE

O principal objetivo da Gestão de Riscos na área de saúde é a redução dos eventos adversos que podem causar danos aos pacientes.

O processo de gestão envolve os seguintes passos, conforme descritos a seguir, e representados na Figura 30.2.

a) Estabelecimento do contexto: definição de estruturas necessárias para determinar os riscos.
b) Identificar os riscos: qualquer colaborador pode identificar e comunicar um provável risco. A comunicação pode ser feita para o gestor imediato, por e-mail, ao setor responsável pelo processo. Os riscos serão listados em tabela específica, por exemplo, Tabela FMEA (*Failure Mode and Effects Analysis*). O FMEA é um conjunto de atividades com o intuito de identificar e avaliar as falhas/erros potenciais do produto/processo e as consequências destas. Além disso, permite registrar as etapas de caracterização do risco e as ações propostas para a sua monitoração.
c) Analisar os riscos: através da gravidade e da probabilidade são priorizados os riscos que, se ocorrerem, causarão o maior impacto ao processo, ao produto ou ao indivíduo.
d) Avaliar os riscos: definir qual estratégia deve ser adotada para cada risco identificado. Essas estratégias podem ser:
   - Aceitar o risco: nenhuma ação é tomada para evitar o risco ou minimizar seus efeitos (ex.: amostra de escarro com > 10 células/campo de 100× ou amostra de urina de saco coletor contaminada em decorrência da coleta, ambos sem definir uma meta aceitável).
   - Minimizar o risco: para os casos que ultrapassam as metas definidas, ações são tomadas para minimizar o impacto do risco ao processo ou produto, caso ele ocorra (ex.: resultados críticos não comunicados, erro de digitação, erro na identificação do paciente, falha no processo de antissepsia para coleta de hemocultura).

- Eliminar ou prevenir o risco: são realizadas ações para eliminar a probabilidade de ocorrência do risco (ex.: inexatidão do CIQ, erro no conteúdo do laudo, extravio de líquidos orgânicos e líquor).
- Terceirizar o risco: essa estratégia significa transferir a outra parte a responsabilidade pelo risco (ex.: contratação de seguros e manutenção de equipamentos).

e) Controle dos riscos: planos de ação para o controle e a minimização dos riscos.

f) Monitoramento e revisão dos riscos: é acompanhado utilizando a tabela FMEA ou outras ferramentas, sendo realizado por:
- Indicadores com metas estabelecidas de acordo com o risco.
- Barreiras criadas no sistema ou processo a fim de identificar falhas e erros.
- Acompanhamento das ações corretivas ou preventivas realizadas para minimizar o efeito do risco.

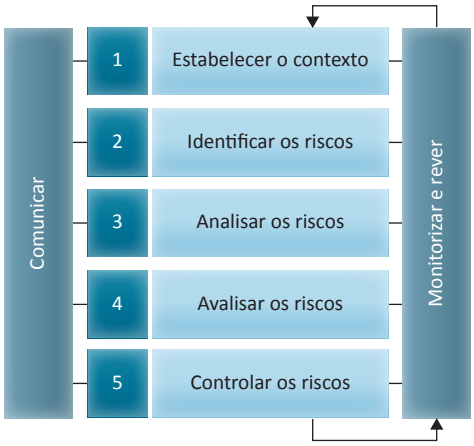


Figura 30.2 Processo de gestão.
Fonte: Adaptada da Norma ISO 31000/2009 – Gestão de Riscos – Princípios e Diretrizes.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. BRASIL. Agência nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 1. Brasília, 2013.
2. BRASIL. Agência nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 2. Brasília, 2013.
3. Clark RB, Lewinski MA, Loeffelholz MJ, et al. Cumitech 31 A, Verification and Validation of Procedure in the Clinical Microbiology Laboratory. Washington: ASM Press, 2009.
4. CLSI. Clinical Laboratory Safety. 3.ed. Approved Guideline. GP17-A3. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
5. CLSI. Nonconforming Event Management. 2.ed. Approved Guideline. QMS11. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
6. CLSI. Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; 3rd Ed, Approved Guideline. M29-A3. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
7. CLSI. Quality Management System: Development and Management of Laboratory Documents; 6th Ed, Approved Guideline. QMS02-A6. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
8. CLSI. Quality Management System: Leadership and Management Roles and Responsibilities; Approved Guideline. GP38--A. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
9. CLSI. Risk Management Techniques to Identify and Control Error Sources. 2.ed. Approved Guideline. EP18-A2. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
10. CLSI. Using Proficiency Testing and Alternative Assessment to Improve Medical Laboratory Quality. 3.ed. Approved Guideline. QMS24. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.
11. College of American Pathologists. Commission on Laboratory Accreditation – Laboratory Accreditation Program, Laboratory General Checklist. CAP: Northfield, 2017.
12. College of American Pathologists. Commission on Laboratory Accreditation – Laboratory Accreditation Program, Microbiology Checklist. CAP: Northfield, 2017.
13. ISO 15189, Laboratório de Analises Clínicas – Requisitos Especiais de Qualidade e Competência. 2.ed. 2017.
14. Lynne SG. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Clinical Microbiology Procedures. 3.ed. Vol. I, II ou III. Washington: ASM Press, 2010
15. Mastroeni MF. Biossegurança aplicada a laboratórios e serviços de saúde. São Paulo: Editora Atheneu, 2004
16. Microbiologia Clinica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência a Saúde. Módulo 7: Detecção e Identificação de Micobacterias de Importância Médica/Agencia Nacional de Vigilância Sanitária – Brasilia: Anvisa, 2013.
17. Microbiologia Clinica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência a Saúde. Módulo 1: Biossegurança e Manutenção de Equipamentos em Laboratório de Microbiologia Clinica / Agencia Nacional de Vigilância Sanitária – Brasilia: Anvisa, 2013.
18. Norma Brasileira. Gestão de riscos – Princípios e diretrizes. ABNT NRR ISO 31000. 1.ed. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://gestravp.files.wordpress.com/2013/06/iso31000-gestc3a3o-de-riscos.pdf
19. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, et al. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2010.
20. SBPC/ML – Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos. Regulamento PALC, Sociedade Brasileira de Patologia Clínica, norma 2016. [Internet] [Acesso em 9 maio de 2018]. Disponível em: http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/norma_palc_2016_web.pdf
21. World Health Organization – Tuberculosis laboratory biosafety manual, 2012.
22. World Health Organization. Laboratory biosafety manual. 3.ed. 2004.

31

capítulo

Carmen Paz Oplustil

Coleta, Transporte e Processamento Inicial de Amostras Clínicas

INTRODUÇÃO

A atividade do laboratório de microbiologia está basicamente concentrada no diagnóstico de doenças infecciosas e para isso ocorrer o isolamento, a identificação e o teste de sensibilidade dos microrganismos é fundamental. Para um exame de microbiologia ser o mais preciso possível, e podermos isolar o agente, a coleta e o transporte da amostra clínica, até ser processada, passam a ser de grande importância para garantir um bom resultado.

Coleta de amostras para os exames de microbiologia

Um ponto importante a considerar é que, em geral, as amostras são coletadas de locais onde existe uma microbiota normal, o que torna o processo de coleta ainda mais importante, já que vamos ter de, durante o processo, minimizar o número de microrganismos contaminantes para poder recuperar o patógeno, se ele estiver presente. Se a amostra for coletada de forma inadequada o resultado do exame na microbiologia estará comprometido.

Alguns pontos importantes a serem considerados antes da coleta das amostras para exames microbiológicos – e todos os que lidam com esta atividade devem ser informados – estão citados a seguir:

1. Coletar a amostra do local da infecção e com o mínimo possível de contaminantes.
2. Verificar o melhor horário para a coleta da amostra para aumentar a possibilidade de recuperar o patógeno.
3. Observar a frequência com que as amostras são colhidas, evitando amostras seguidas quando às vezes o resultado da primeira cultura ainda não está disponível.
4. Obter uma quantidade suficiente de amostra para realizar os exames solicitados nas condições estabelecidas pela microbiologia.
5. Realizar a coleta com insumos adequados para garantir o isolamento do patógeno.
6. Quando possível, coletar as amostras antes do uso de antibióticos.
7. O insumo utilizado para a coleta deve ser identificado apropriadamente com, no mínimo, nome do paciente, número de identificação do paciente, local de onde foi coletada a amostra, e data e hora da coleta.

Os pontos citados são importantes e devem ser seguidos, mas não podemos nos esquecer de que muitas vezes temos de ter certa flexibilidade já que as amostras clínicas enviadas podem ser as melhores amostras, ou a única amostra obtida do paciente. Por isso, antes de rejeitar as amostras (Quadro 31.1) devemos analisar o paciente, o local de coleta da amostra e verificar se outra amostra ou uma amostra melhor pode ser obtida.

Existem duas formas de abordar a coleta de amostras clínicas para os exames microbiológicos: uma é com foco no material clínico que será coletado, e outra é com foco na doença infecciosa que o médico suspeita. Nos quadros a seguir apresentamos esses dois focos da coleta, sendo que o laboratório de microbiologia utiliza com maior frequência a que se baseia no material clínico coletado (Quadro 31.1) já que na maioria das vezes é difícil saber a suspeita clínica. Para evitar problemas na coleta e no transporte de amostras, o laboratório deve disponibilizar um manual de coleta de amostras e orientar frequentemente todos os profissionais envolvidos no processo. O Quadro 31.2 é um manual de coleta simples e objetivo, direcionado para as pessoas que fazem a coleta das amostras clínicas para os exames de microbiologia, por isso as informações primordiais são a forma de coleta, onde deve ser coletada a amostra e a forma de envio (temperatura e tempo de transporte) até o laboratório. Já o Quadro 31.3 é de suma importância para que o laboratório possa orientar o médico em dúvidas sobre qual é o melhor material clínico a ser obtido para o diagnóstico. Esse quadro serve também como guia quando a coleta é feita por profissionais da saúde não relacionados ao laboratório. Lembrando que nem todo material que se obtém de um sítio de infecção pode representar

Quadro 31.1 Alguns critérios mais empregados nos laboratórios de microbiologia para a rejeição de amostras.

Critério	Procedimento
Amostras recebidas sem identificação	Solicitar a identificação da amostra ou nova amostra
Amostras com uma identificação, e o pedido está com outra identificação	Solicitar nova amostra ou verificar com coletador a troca
Amostra sem identificação do material clínico	Solicitar ao coletador que identifique o tipo de amostras
Amostra sem solicitação de exames	Verificar com o médico que tipo de exame ele quer que seja realizado
Amostra enviada em substância fixadora tipo formol	Notificar e não processar
Sonda vesical	Notificar e não processar
Urina recebida com mais de 24h de colhida e não refrigerada	Solicitar nova amostra
Amostra em frasco que está vazando	Solicitar nova amostra. A cultura fica comprometida porque não se sabe durante o transporte se algo também entrou no frasco
Frasco com saco coletor dentro, e o mesmo vazando	Solicitar nova amostra porque a parte externa do saco entrou em contato com a amostra
Solicitação de cultura de anaeróbios de amostras colhidas em frascos que não são apropriados	Solicitar nova amostra e orientar quais são os materiais específicos para coleta desse tipo de exame
Solicitação de cultura de anaeróbios de lavado broncoalveolar ou escarro	Explicar ao solicitante que nesse tipo de material clínico não existe a possibilidade de se isolar esse tipo de microrganismo
Amostras de escarro com aspecto de saliva e depois de realizado o Gram são observados < 25 leucócitos e > 10 células epiteliais	Solicitar nova amostra e fornecer instruções adequadas para o paciente realizar a coleta
Amostra de fezes sólidas para pesquisa de *Clostridium difficile*	Não processar e explicar que o agente provoca diarreia e que em fezes sólidas o resultado vai ser negativo

Fonte: Oplustil CP, *et al*., 2010.

um material adequado para um exame microbiológico, por isso a coleta é fundamental. A preparação do local de coleta é importante para eliminar os microrganismos da microbiota, e para isso existem algumas indicações específicas para cada caso, que estão descritas nos quadros.

Transporte de amostras

Quando falamos de transporte das amostras clínicas estamos nos referindo ao meio de transporte (frasco, tubo, meio de cultura, lâmina) em que colocamos a amostra clínica depois de coletada, as condições ambientais em que esse material é transportado, e em quanto tempo a amostra depois de colhida deve chegar ao laboratório para ser processada sem prejudicar o exame. Quando falamos do tempo para chegar ao laboratório não podemos nos esquecer de considerar que, muitas vezes, a amostra pode ficar até 24 horas refrigerada, por exemplo, até ser processada, mas vale ressaltar a validade clínica desse exame após um tempo de espera para o processamento tão longo.

Existem alguns microrganismos que requerem condições especiais de transporte para que possam ser isolados posteriormente no laboratório. No Quadro 31.4 exemplificamos alguns microrganismos que podem ter o crescimento afetado devido a um transporte inadequado.

Quadro 31.2 Orientações gerais de coleta, insumos para realizar a coleta, tempo e temperatura de transporte para os materiais clínicos mais frequentemente coletados para cultura de bactérias.

Material clínico	Materiais para coleta	Orientações para coleta e volume	Volume mínimo e frequência de coleta	Tempo/ temperatura de transporte	Comentários
Abscesso	• Solução fisiológica estéril (SF) • *Swab* com meio de transporte ou seringa e agulha estéreis • Clorexidina a 0,2% solução aquosa ou álcool 70% • Frasco estéril ou frasco de hemocultura	Remover o exsudato da superfície com SF e fazer assepsia com clorexidina ou álcool 70%	Mínimo 1 mL ou 1 *swab* em meio de transporte e 1 lâmina 1/dia/local	*Swab* - máximo 2h TA Seringa - máximo 2 h TA	*Swab* não é o melhor material para a coleta, mas em algumas situações é o único que existe disponível. Ideal utilizar um *swab* com um bom meio de transporte e coletar dois *swabs*, um para cultura outro para o Gram
Aberto		Aspirar o material do fundo da lesão ou passar firmemente o *swab* no fundo da lesão (não na superfície). O aspirado deve ser colocado em um frasco estéril ou frasco de hemocultura. Com um *swab* sem meio de transporte, fazer uma lâmina para Gram			
Fechado		Puncionar com seringa e agulha estéreis do fundo da lesão e colocar em um frasco estéril (pode ser utilizado frasco de hemocultura)			
Biópsia ou fragmentos	• Frasco ou tubo estéril • SF estéril	Colocar fragmento de biópsia em frasco ou tubo estéril contendo SF estéril	NA	Máximo 15 min TA	Se não puder colocar em SF, enviar a biópsia no frasco estéril seco
Celulite	• Álcool 70% • Seringa e agulha fina • Frasco estéril ou frasco de hemocultura • SF estéril	Fazer antissepsia da pele com álcool 70%. Aspirar a área de maior inflamação com uma agulha fina (em geral, é a área mais central). Colocar a amostra em um frasco estéril ou frasco de hemocultura	Mínimo 1 mL	Máximo 2h TA	Em algumas ocasiões pode ser necessário introduzir um pouco de SF antes de aspirar o material

(*Continua*)

Quadro 31.2 Orientações gerais de coleta, insumos para realizar a coleta, tempo e temperatura de transporte para os materiais clínicos mais frequentemente coletados para cultura de bactérias.

(*Continuação*)

Material clínico	Materiais para coleta	Orientações para coleta e volume	Volume mínimo e frequência de coleta	Tempo/ temperatura de transporte	Comentários
Cateter venoso	• Tubo ou frasco estéril seco • Álcool 70% • Tesoura estéril	Fazer antissepsia da pele em volta do cateter com álcool 70%. Remover o cateter e cortar com tesoura estéril, de 5 a 7 cm da ponta distal Colocar em frasco ou tubo estéril seco	NA	Máximo 1h TA	É recomendada a coleta de sangue do cateter e não mais a retirada do cateter para cultura. Cateteres que podem ser processados: cateter central, Hickman, periféricos Swan-Ganz
Escarro	• Frasco estéril	Solicitar ao paciente para lavar a boca. Orientar a tossir profundamente. Coletar a amostra diretamente no frasco estéril	Ideal >1 mL 1/dia	Máximo 2h TA	Explicar ao paciente como deve ser feita a coleta para evitar amostras de saliva
Escarro induzido	• Frasco estéril	Solicitar ao paciente para lavar a boca. Nebulizar aproximadamente 25 mL de SF 3-10%. Coletar a amostra no frasco	Todo o volume obtido	Máximo 2h TA	
Fezes	• Frasco de tampa de rosca com ou sem meio de transporte	Colocar no máximo 2 g (1 colher de sobremesa) de fezes no frasco com ou sem meio de transporte	Ideal de 2 g a 5 g de fezes	Máximo 2h em frasco seco máximo 12h em frasco com conservante	Especificações são para pesquisa de *Shigella*, *Salmonella* e *E. coli* enteropatogênicas
Fezes (pesquisa de *Clostridium difficile*)	• Frasco seco de boca larga e tampa de rosca	Colocar a amostra de fezes líquidas no frasco. Tampar corretamente	Máximo 10 mL 1/dia	Máximo 1h	Não receber fezes sólidas
Lavado ou escovado bronco- alveolar	• Frasco ou tubo estéril seco	Coletar o lavado em um tubo estéril ou em mais de um tubo. A escova pode ser colocada dentro do frasco estéril, e ser enviada	Ideal > 1 mL ou a escova	Máximo 2h TA	Após a coleta de lavado, identificar corretamente os tubos de acordo com a sequência em que foram obtidos (1,2,3)

Secreção traqueal	• Frasco ou tubo estéril seco	Coletar a amostra e colocar em frasco estéril	Ideal > 1 mL	Máximo 2h TA	
Sangue	• Álcool 70% • Frasco de hemocultura específico • Seringa e agulha estéril • Clorexidina alcoólica 0,5%	Fazer antissepsia do local da punção com clorexidina alcoólica 0,5%, com movimentos circulares de dentro para fora. Não apalpar a veia após a antissepsia. Coletar o volume de sangue necessário de acordo com o frasco. Limpar a tampa do frasco com álcool 70% antes de injetar o sangue	Adultos - mínimo 20 mL, 10 mL no frasco aeróbio e 10 mL no frasco anaeróbio. Crianças - 1 a 4 mL e colocar em frascos pediátricos. Frequência - depende da suspeita clínica. Não é recomendada a coleta de outra amostra até obter um resultado parcial de 24h	Ideal até 2h TA Máximo 12h TA O tempo para envio ao laboratório irá depender do método que está sendo utilizado.	Coletar a amostra na ascensão da temperatura (não no pico febril). Não trocar a agulha antes de injetar a amostra no frasco.
Líquor	• Tubo estéril • Materiais utilizados para punção	Fazer antissepsia do local. Puncionar conforme normas internas. Coletar e colocar em tubo estéril seco	Mínimo 1 mL para bactérias, 2 mL para micobactérias, 2 mL para fungos	Máximo 15 min TA depois manter refrigerado	Se forem realizados testes bioquímicos, coletar em 2 tubos. Se for colhido apenas 1 tubo, enviar para a Microbiologia primeiro
Líquidos estéreis (líquido ascítico, pleural, sinovial, de diálise, biliar, pericárdico, peritoneal)	• Álcool 70% ou clorexidina a 0,2% em solução aquosa. • Seringa e agulha • Frasco de hemocultura	Realizar antissepsia com álcool ou clorexidina da pele. Puncionar e colocar o líquido em tubo ou frasco estéril ou em frasco de hemocultura	Ideal > 1 mL	Máximo 2h TA	Se houver suspeita de anaeróbios colocar em frasco de hemocultura anaeróbio
Secreção conjuntival	• *Swab* específico com meio de transporte • *Swab* sem meio de transporte • Lâminas para bacterioscopia • SF estéril	Coletar sempre dos dois olhos e identificar corretamente Umidificar o *swab* com SF Rolar o *swab* sobre a conjuntiva e fazer a lâmina. Para *swab* com meio de transporte realizar o mesmo procedimento descrito acima. Colocar o *swab* dentro do meio de transporte	1 *swab* de cada olho e duas lâminas	Máximo 2h TA	

(*Continua*)

Quadro 31.2 Orientações gerais de coleta, insumos para realizar a coleta, tempo e temperatura de transporte para os materiais clínicos mais frequentemente coletados para cultura de bactérias.

(*Continuação*)

Material clínico	Materiais para coleta	Orientações para coleta e volume	Volume mínimo e frequência de coleta	Tempo/ temperatura de transporte	Comentários
Raspado de Córnea	• Espátula oftalmológica apropriada • SF estéril • Lâminas • Placas de meio de cultura	Aplicar anestésico. Com a espátula, raspar as lesões. Inocular com a própria espátula o material em placas de AS e CHOC. Coletar material e colocar em duas lâminas	Material em meio de cultura e duas lâminas	Máximo 2h TA	Este procedimento deve ser realizado pelo oftalmologista
Secreção vaginal e cervical	• *Swab* com meio de transporte • *Swab* sem meio de transporte • Espéculo • Lâminas	Se houver muita secreção, limpar com uma gaze. Colocar o espéculo. Com um dos *swabs* coletar material da parede vaginal, fazer esfregaços em duas lâminas e desprezar o *swab*. Com o *swab* com meio de transporte, coletar material cervical e parede vaginal e colocar no meio de transporte. Com um *swab* estéril, colher material cervical e fazer esfregaços em duas lâminas	Um *swab* para cultura e lâminas	Máximo de 12h TA	As lâminas, devidamente identificadas, devem ser colocadas em um porta-lâminas
Secreção uretral	• *Swab* com meio de transporte • *Swab* sem meio de transporte • Lâminas	**Mulher**: Remover a secreção, se houver, com uma gaze. Massagear a uretral para sair a secreção, coletar com o *swab* e fazer duas lâminas Com o *swab* com meio de transporte coletar mais secreção. **Homem**: introduzir o *swab* e coletar o material, fazer duas lâminas. Com o *swab* com meio de transporte, introduzir e coletar mais material.	Um *swab* para cultura e lâminas	Máximo 12h TA	

Secreção nasal	• *Swab* c/ meio de transporte • SF estéril	Umedecer o *swab* em SF. Introduzir na narina (máximo 2,5 cm) fazendo movimentos rotatórios. Colocar dentro do meio de transporte. Repetir na outra narina	Um *swab* de cada narina	Máximo de 12h TA	Coletar sempre das duas narinas
Secreção de orofaringe	• *Swab* c/ meio de transporte • Lâminas • *Swab* sem meio de transporte • Abaixador de língua	Abaixar a língua e coletar das tonsilas ou região inflamada. Fazer uma lâmina Desprezar o *swab*. Com o *swab* com meio de transporte repetir o processo e colocar dentro do meio de transporte	Um *swab* e 1 lâmina	Máximo de 12h TA	
Tecido queimado	• Álcool 70% • Instrumento próprio para coleta de amostras de tecido queimado (*punch*)	Limpar a superfície da pele com álcool 70% para retirar os microrganismos contaminantes. Com o *punch* retirar um fragmento do tecido. Colocar no frasco estéril com SF	Mínimo 1 fragmento	Máximo 2h TA	Pesar o frasco antes de enviar o mesmo para a coleta
Urina de paciente sondado	• Frasco estéril • Seringa e agulha	Fazer desinfecção da cânula e puncionar com uma seringa. Coletar a amostra em um frasco estéril	Mínimo de 1 mL 1/dia	Máximo 2h TA 12 h refrigerado	Se houver solicitação de exame de urina o volume mínimo pode variar
Urina de jato médio (Homem)	• Frasco estéril • Sabão e água • Gaze ou algodão	Limpar a glande com uma gaze embebida em água e sabão. Enxaguar com água e secar com gaze ou algodão. Retrair o prepúcio e desprezar o primeiro jato e colher o jato médio	Mínimo de 1 mL 1/dia	Máximo 2h TA 12h refrigerado	Se houver solicitação de exame de urina o volume mínimo pode variar
Urina de jato médio (Mulher)	• Frasco estéril • Sabão e água • Gaze ou algodão	Limpar a região genital com água e sabão. Enxaguar com água e secar com gaze ou algodão. Segurar os grandes lábios com a mão, desprezar o primeiro jato e colher o jato médio	Mínimo de 1 mL 1/dia	Máximo 2 h TA 12h refrigerado	Se houver solicitação de exame de urina o volume mínimo pode variar

(*Continua*)

Quadro 31.2 Orientações gerais de coleta, insumos para realizar a coleta, tempo e temperatura de transporte para os materiais clínicos mais frequentemente coletados para cultura de bactérias.

(*Continuação*)

Material clínico	Materiais para coleta	Orientações para coleta e volume	Volume mínimo e frequência de coleta	Tempo/ temperatura de transporte	Comentários
Urina sem especificação de jato	• Frasco estéril • Sabão e água • Gaze ou algodão	Limpar a região genital com água e sabão. Enxaguar com água e secar com algodão ou gaze. Segurar os grandes lábios com a mão ou retrair o prepúcio e coletar a urina	Mínimo de 1 mL 1/dia	Máximo 2h TA 12 h refrigerado	Se houver solicitação de exame de urina o volume mínimo pode variar
Urina com saco coletor	Saco coletor Sabão e água Gaze ou algodão Frasco estéril	Limpar a área genital com água e sabão. Enxaguar com água e secar Colocar o saco coletor. Retirar o saco coletor e colocar toda a urina em um frasco estéril Desprezar o saco	Mínimo 1 mL 1/dia	Máximo 2h TA 12h refrigerado	Fazer a troca do saco coletor a cada 1h
Secreção de ferida cirúrgica	• Solução fisiológica estéril (SF) • *Swab* com meio de transporte • Clorexidina a 0,2% em solução aquosa ou álcool 70%. • Lâminas	Remover o exsudato da superfície com SF e fazer assepsia com clorexidina ou álcool 70%. Passar firmemente o *swab* sem meio de cultura no fundo da lesão (não na superfície) e fazer duas lâminas. Com o *swab* com meio de cultura repetir o processo	Mínimo 1 *swab* e lâmina 1/dia/local	Máximo 2h TA	*Swab* não é o melhor material para a coleta, mas em algumas situações é o único que existe disponível. Ideal utilizar um *swab* com um bom meio de transporte

NA: não aplicável.

Fonte: Adaptado de Oplustil CP, *et al*., 2010. Garcia LS; *et al*., 2010. Gómez LS; *et al*., 2003.

Quadro 31.3 Amostras clínicas recomendadas para o diagnóstico das principais doenças infecciosas.

Tipo de infecção	Amostra	Material para a coleta	Comentários
Bacteremia	Hemocultura	Frasco de hemocultura	
Infecções cardiovasculares e associadas a dispositivos intravasculares			
Endocardite	Hemocultura/válvula cardíaca	• Frasco de hemocultura • Frasco estéril	
Infecção do cateter	Hemocultura colhida do cateter e no mesmo momento uma hemocultura colhida de sangue periférico. Ponta de cateter	• Frasco de hemocultura • Tubo ou frasco estéril seco	O ideal é realizar a coleta do sangue do cateter e da veia periférica
Pericardite	Líquido pericárdico	Frasco estéril ou frasco de hemocultura	
Sistema nervoso			
Meningite	LCR	Tubo estéril seco	
Abcessos cerebrais	Punção dos abcessos	Tubo estéril seco ou frasco de hemocultura	
Trato respiratório			
Faringoamigdalite	Secreção	Swab	
Otite externa	Secreção	Swab	
Otite média	Timpanocentese	Tubo estéril	
Sinusite	Aspirado sinusal	Tubo estéril	
Pneumonia	Escarro, lavado broncoalveolar, secreção traqueal	Frasco estéril	O material irá depender das condições clínicas do paciente e da suspeita do agente da pneumonia
Empiema e abscessos pulmonares	Líquido pleural Aspirados dos abscessos	Frasco de hemocultura ou frasco estéril	
Infecções oculares			
Conjuntivite	Secreção conjuntiva	Swab	
Ceratite	Raspado de córnea	Espátula oftalmológica Meios de cultura já semeados	
Endoftalmite	Líquido intraocular	Seringa	
Infecções gastrointestinais			
Diarreia	Fezes	Frasco com ou sem conservante	
Infecções intra-abdominais			
Peritonite	Líquido peritoneal	Frasco estéril ou frasco de hemocultura	Dependendo do volume é melhor que seja enviada toda amostra para o laboratório

(*Continua*)

Quadro 31.3 Amostras clínicas recomendadas para o diagnóstico das principais doenças infecciosas. (*Continuação*)

Tipo de infecção	Amostra	Material para a coleta	Comentários
Abscessos	Aspirado dos abcessos	Fracos ou tubo estéril, frasco de hemocultura	
Colecistite	Líquido biliar	Fracos ou tubo estéril, frasco de hemocultura	
Trato urinário			
Infecção urinária	Urina jato médio Urina com saco coletor Urina de qualquer jato	Frasco ou tubo estéril Frasco com conservante	O conservante mais utilizado é o ácido bórico
Trato genital			
Úlceras genitais	Raspado de úlcera	Lâmina	
Nódulos genitais	Aspirado de nódulos	Tubo estéril	
Uretrites	Secreção uretral	*Swab* e lâminas	
Vulvovaginite	Secreção vaginal	*Swab* e lâminas	
Cervicite	Secreção endocervical	*Swab* e lâminas	
Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* (grupo B)	Material do introito vaginal e retal	*Swab* e lâminas	
Prostatite	Secreção prostática	Frasco estéril	Coletar sempre urina pré e pós-massagem prostática
Pele e tecidos moles			
Impetigo, foliculite, celulite, erisipela	Aspirado secreção	Frasco ou tubo estéril *swab*	
Pele queimada	Fragmento de tecido	Frasco estéril	
Ossos e articulações			
Artrite	Líquido sinovial	Frasco ou tubo estéril Frasco de hemocultura	
Osteomielite	Biópsia de osso exsudato	Frasco ou tubo estéril	

Fonte: Informações cedidas pela autora

Quadro 31.4 Exemplos de alguns microrganismos que requerem condições especiais para o transporte ao laboratório após a coleta do material clínico.

Microrganismo	Condição
Streptococcus pneumoniae	Em geral são sensíveis a baixas temperaturas e se autolizam.
Neisseria gonorrhoeae	São sensíveis a temperaturas extremas e precisam de meios de transporte que mantenham a umidade.
Anaeróbios	São sensíveis ao oxigênio, portanto devem ser acondicionados em frascos sem oxigênio.
Mycoplasma e *Ureaplasma*	Necessitam de meio de transporte especifico, já que não possuem parede celular.
Chlamydia	Microrganismos intracelulares e devem ser transportados em meios específicos, que não eliminem o microrganismo. Alguns *swabs* são tóxicos para o microrganismo.

Fonte: Informações cedidas pela autora

Processamento inicial das amostras no laboratório

Devido à diversidade de amostras clínicas que podem ser processadas na microbiologia, o processo inicial é fundamental para obtermos um resultado de acordo com o esperado, que seria a detecção pelo exame direto da amostra ou pelo isolamento dos microrganismos envolvidos no processo infeccioso.

O processamento inicial das amostras passa por algumas etapas de decisão, que vão depender do tipo de microrganismos que serão pesquisados (micobactérias, fungos, bactérias aeróbias ou anaeróbias), e se são necessários testes diretos. A primeira etapa é verificar que tipo de amostra será processado. Com essa informação, o passo seguinte é o de selecionar os meios mais apropriados e, por último, em que condições de temperatura e atmosfera vamos incubar esses meios.

O exame direto da amostra clínica em geral é realizado após coloração de (Gram ou Ziehl), ou diretamente do material clínico que chamamos de exame a fresco. Outras colorações mais específicas podem ser utilizadas, dependendo da amostra clínica e do patógeno que esperamos detectar. Existe grande quantidade de meios de cultura para o isolamento da maioria dos patógenos e neste capitulo abordamos os meios mais frequentemente utilizados na rotina laboratorial.

O Quadro 31.5 mostra os meios mais comumente empregados na rotina do laboratório de microbiologia clínica e suas

Quadro 31.5 Meios de cultura mais frequentemente empregados na rotina microbiológica.

Meio	Finalidade	Atmosfera de incubação
AS (ágar sangue)	Meio não seletivo e diferencial que permite o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além de permitir a visualização de hemólise.	Aero, CO_2 e anaerobiose
CHOC (ágar chocolate)	Meio nutritivo que permite o crescimento da maioria das bactérias, especialmente *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*.	CO_2
TM (Thayer-Martin)	Meio seletivo utilizado para isolamento de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*. Inibe a maioria das outras bactérias.	CO_2
MC (MacConkey)	Meio seletivo e diferencial que permite o crescimento de bacilos Gram-negativos, diferenciando as bactérias em lactose positiva e negativa. Inibe bactérias Gram-positivas.	Aero/CO_2*
EMB (*eosin methilene blue*)	Meio seletivo e diferencial que permite o crescimento de bacilos Gram-negativos, diferenciando as bactérias em lactose positiva e lactose negativa. Inibe bactérias Gram-positivas.	Aero
SS (*Salmonella/Shigella*)	Meio seletivo e diferencial para o isolamento de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. Detecta a produção de H_2S.	Aero
THIO (caldo tioglicolato)	Meio de enriquecimento que favorece o desenvolvimento da maioria das bactérias.	Aero
CLED (*cystine lactose electrolyte deficient agar*)	Meio que permite o crescimento de variado número de bacilos Gram-negativos e cocos Gram-positivos. Devido à sua composição deficiente em eletrólitos, há inibição do véu de *Proteus* spp.	Aero
TETRA (caldo Tetrationato)	Meio de enriquecimento para *Salmonella* spp.	Aero
Karmali/AS Campy (ágar sangue *Campylobacter*)	Meios seletivos para isolamento de *Campylobacter* spp.	Microaerofilia
TODD (caldo Todd-Hewitt)	Meio de enriquecimento suplementado com ácido nalidíxico e gentamicina ou colistina, para o isolamento de estreptococos.	Aero
BHI (caldo *brain Heart Infusion*)	Meio que permite o crescimento da maioria das bactérias e se suplementado permite o crescimento de bactérias anaeróbias e fastidiosas.	Aero

Aero = aerobiose; CO_2 = atmosfera de CO_2; *Alguns laboratórios que utilizam incubadora de CO_2 optam por incubar a placa de MC em conjunto com AS e/ou CHOC.
Fonte: Adaptada de Oplustil *et al.*, 2010.

principais características para que o laboratório possa escolher o meio que agrega maior valor ao seu fluxo de trabalho diário na expectativa de isolamento de determinados agentes.

Todos os meios de cultura devem passar por um controle de qualidade para verificar as suas propriedades. Se os meios são fabricados no laboratório, esse controle deve ser feito internamente, de cada lote produzido; se comprados prontos, o controle de qualidade deve ser feito apenas dos meios: Karmali, AS Campy, TM e CHOC.

O processamento das amostras deve ser o mais rápido possível quando estas chegam ao laboratório, mas sabemos que muitas vezes as amostras chegam em grande quantidade, e ao mesmo tempo. Quando isso ocorre, o ideal é priorizar as amostras. O Quadro 31.6 mostra uma sugestão de priorização das amostras para processamento quando da chegada ao laboratório.

Como foi mencionado, os meios de cultura para processamento inicial das amostras devem ser escolhidos, dependendo do que esperamos isolar no material clínico em questão. Para alguns materiais, uma placa pode ser suficiente; já em amostras clínicas que possuem microbiota normal, muitas vezes é necessário utilizar uma combinação de meios, incluindo alguns meios seletivos e até diferenciais (Quadro 31.7). É primordial que o Gram seja realizado para ter como comparar e interpretar depois com o crescimento na cultura. No Gram podemos ver que tipo de bactéria está presente na amostra, se tem muitos leucócitos, e em alguns casos serve para verificar a qualidade da amostra (escarro). Se não houver material suficiente para fazer o Gram, devemos dar prioridade à cultura. Para preparar o Gram de líquidos estéreis o recomendado é utilizar uma citocentrífuga, principalmente se a amostra for um líquor.

Existem algumas técnicas de semeadura da amostra nos meios de cultura e irá basicamente depender do material clínico que está sendo processado. Geralmente utilizamos na microbiologia as técnicas de semeadura por esgotamento, e a quantitativa. Toda semeadura de amostra deve, preferencialmente, ser realizada dentro de uma cabine de segurança biológica certificada para proteger a amostra e o colaborador.

Na semeadura por esgotamento (Figuras 31.1 e 31.2) o ideal seria flambar a alça que estamos utilizando para semear cada quadrante. Se estivermos utilizando uma alça descartável, o ideal seria trocar a alça, mas sabendo que isso aumenta muito o custo do exame, a recomendação é que ao semear nos outros quadrantes não passemos novamente a alça na semeadura do quadrante anterior, assim podemos ter colônias isoladas. No caso de líquidos estéreis é recomendado semear o primeiro quadrante com uma alça e trocar a alça para semear nos quadrantes seguintes, porque se houver algum contaminante na placa que, por acaso, não foi observado a princípio este pode dificultar a interpretação do crescimento posteriormente. Se estivermos utilizando uma alça de platina é só flambar entre as semeaduras. Evitar tocar as bordas da placa com a alça durante a semeadura.

Quando estamos semeando amostras de orofaringe, que podem ter estreptococos com hemólise β, o ideal é fazer pequenos cortes no meio nos diferentes quadrantes. Isso permite melhor visualização de hemólise se eventualmente tivermos poucas colônias desses agentes.

A técnica de semeadura quantitativa (Figura 31.3) deve ser realizada com uma alça de platina ou descartável que esteja calibrada. Amostras de urina devem sempre ser semeadas de forma quantitativa porque o resultado reportado é em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Amostras de secreção traqueal e lavado broncoalveolar também devem ser semeadas de forma quantitativa, após as diluições correspondentes.

Quadro 31.6 Sequência de processamento de amostras na microbiologia quando são recebidas ao mesmo tempo.

Sequência	Amostras	Tempo máximo para processamento
1	Amostras de cirurgias e líquidos estéreis	20 min depois de recebidos
2	Líquor	20 min depois de recebidos
3	Lavado broncoalveolar	20 min depois de recebidos
4	Tecidos	1h
5	Outros líquidos	1h
6	Amostras de fezes sem conservantes	30 min após coleta ou colocar em conservante ao chegar
7	Escarro e trato respiratório inferior	1h a temperatura ambiente e 2h se refrigerada
8	Hemocultura	4h a temperatura ambiente
9	*Swab*	8h
10	Urina	Até 24h se refrigerada

Fonte: Informações cedidas pela autora

Quadro 31.7 Sugestão de processamento inicial de materiais clínicos frequentemente recebidos na microbiologia, meios de cultura e coloração de Gram.

Material cínico	Gram	AS	MC	CHOC	TM	Tio	CLED	SS	Tetra ou Sel	FH
Abscesso[6]	X	X	X	X[2]		X				X[2]
Biópsias	X[2]	x		x						
Escarro	x	x	X[1]	x						
Esperma[3]	X[2]	x								
Fezes			x					x	x	
Fragmento de tecido	X[2]	x		x		X				
LBA	x	X	X	x						
Líquido amniótico[4, 6]	X	X		x		X[8]				X
Líquido ascítico, pericárdico, peritoneal, biliar,[4]	x	x	x			X[8]				X
Líquido pleural	x	x		x		X[8]				X
Líquido sinovial	x	x	x			X[8]				x
Líquor	x	x	X[9]	x		x				
Medula óssea										x
Sangue										x
Secreção conjuntival	X	x		x						
Secreção de ferida profunda[6]	x	x	x							
Secreção de ferida superficial	x	x	x							
Secreção de orofaringe	x	x		x						
Secreção prostática[3]	X[2]	x			x					
Secreção traqueal[3]	x	x	x	x						
Secreção uretral	x	x		x	x					
Secreção vaginal e/ou cervical	x	x		X[7]	x					
Urina de 1º jato[3]	x	x			x					
Urina de jato médio[3,5]			x				x			

AS = ágar sangue; CHOC = ágar chocolate; MC = ágar MacConkey; TM = ágar Thayer-Martin; THIO = caldo tioglicolato; CLED = *cystine lactose electrolyte deficient*; SS = ágar *Salmonella-Shigella*; Tetra = caldo tetrationato; SEL: caldo selenito; FH = frasco de hemocultura; LBA: lavado broncoalveolar; [1] meio utilizado para amostras de escarro de pacientes hospitalizados; [2] opcional; [3] cultura quantitativa;[4] volumes < 1 mL semear por esgotamento em meios apropriados, volumes maiores colocar diretamente no frasco de hemocultura respeitando a capacidade do frasco;[5] as opções para cultura de urina jato médio podem ser CLED/MC, ou meio cromogênico ou laminocultivo; [6] sugere-se semeadura para anaeróbios; [7] paciente com idade inferior a 12 anos; [8] dispensável quando utilizado frasco de hemocultura; [9]: quando amostra de derivação.

Fonte: Adaptado de Oplustil *et al*., 2010.

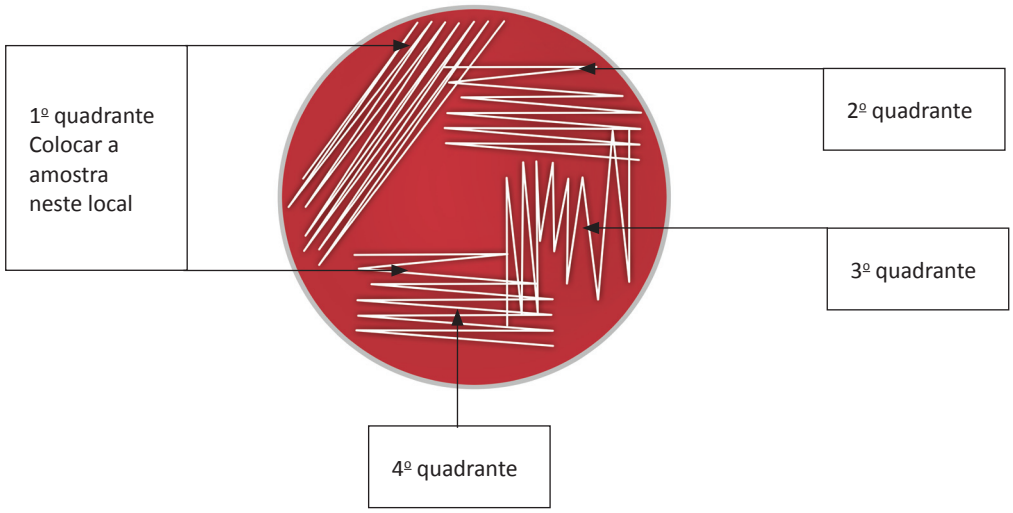


Figura 31.1 Técnica de semeadura por esgotamento.
Fonte: Adaptada de Oplustil CP; *et al*., 2010. Garcia LS; *et al*., 2003.

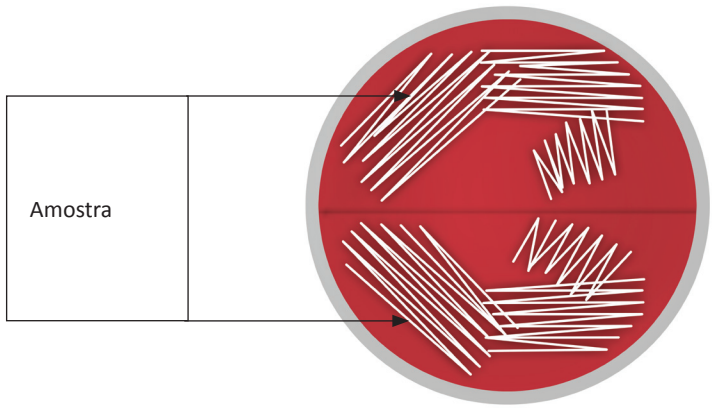


Figura 31.2 Técnica de semeadura por esgotamento de placas divididas.
Fonte: Imagem fornecida pela Autora

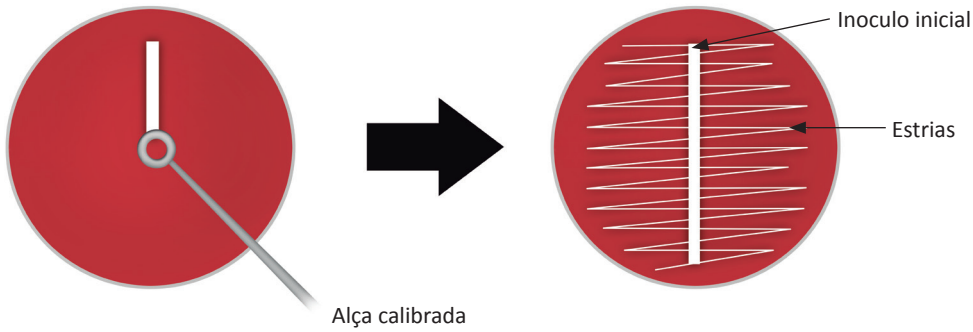


Figura 31.3 Técnica de semeadura quantitativa.
Fonte: Adaptada de Oplustil *et al*., 2010.

Após o correto processamento inicial das amostras, a última etapa é a de escolher a correta forma de incubar as placas para isolamento dos agentes. O Quadro 31.8 mostra as temperaturas e as atmosferas mais frequentemente utilizadas na rotina para incubar os meios de cultura.

Quadro 31.8 Temperatura e atmosfera para incubar os meios de cultura nas principais incubadoras utilizadas na rotina microbiológica.

Temperatura (tolerável variação de ± 2°C)	Atmosfera	Finalidade/meios de cultura
35 °C	Ar ambiente	Crescimento da maioria dos microrganismos/Caldo BHI, Tio, tetra/Sel, placas de MC, AS, SS, CLED e frascos de hemocultura de método manual
35 °C	5%-10% de CO_2	Crescimento da maioria dos microrganismos, incluindo os microrganismos fastidiosos *(S. pneumoniae, H.influenzae, N. meningitidis)*/ placas de AS, CHOC, TM, MC (opcional)
42 °C	Ar ambiente (se necessária microaerofilia, colocar um gerador específico que produz 5%-15% de O_2 e 10% CO_2)	Isolamento de *Campylobacter* spp./Karmali ou AS Campy
30 °C	Ar ambiente	Meios para fungos
37 °C	Ar ambiente	Micobactérias

Fonte: Adaptada de Oplustil CP, *et al*., 2010. Garcia LS; *et al*., 2010. Gómez LS; *et al*., 2003.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Araujo MRE. Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. J Infect Control. 2012;1(1):8-19.
2. Balows A, Hausler Jr WJ, Hermann KL, et al. Manual of Clinical Microbiology. 5.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991.
3. Baron EJ, et al. Cumitech 1 C, Blood Cultures IV. Washington: ASM Press, 2005.
4. Garcia LS, Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3.ed, Vol. 1e 2. Washington: American Society for Microbiology, 2010.
5. Gómez CG, Carillo CS. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiologia. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2003.
6. Isenberg HD. Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington: American Society for Microbiology, 1998.
7. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, et al. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.
8. Mendes CM, Oplustil CP, Zoccoli CM, et al. Microbiologia Clinica: 156 perguntas e respostas. São Paulo: Sarvier, 2005.
9. Miller JM. A Guide to Specimen Management in Clinical Microbiology. Washington: American Society for Microbiology, 1996.
10. Oplustil CP, et al. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2010.

Alessandro Conrado de Oliveira Silveira ▪ Mara Cristina Scheffer

Uroculturas

INTRODUÇÃO

Infecções do trato urinário (ITUs) estão entre os processos infecciosos mais comuns, originando grande número de consultas médicas. Apesar da baixa mortalidade associada, podem evoluir para quadros graves, como pielonefrites e urosepse.

Uroculturas ocupam grande parte do fluxo de trabalho nos laboratórios de microbiologia clínica, visto que ITUs são frequentes, e a obtenção da amostra é simples e geralmente não invasiva. Sistemas comerciais facilitam a identificação de uropatógenos, diminuindo custos e agilizando o trabalho. Em geral, os uropatógenos podem ser facilmente isolados e identificados. No entanto, a interpretação da urocultura está sujeita a diferentes variáveis, que devem ser cuidadosamente analisadas para garantir um resultado representativo do processo infeccioso.

CONSIDERAÇÕES SOBRE COLETA E TRANSPORTE DE URINA PARA CULTURA

A coleta apropriada da urina é um procedimento determinante na qualidade final da análise. Considerando que a urina retida na bexiga é estéril, deve-se seguir rigorosamente os procedimentos padronizados para minimizar a possibilidade de contaminação com bactérias da microbiota normal durante o processo de coleta.

A amostra deve ser coletada preferencialmente no laboratório, e, sempre que possível, antes do início da antibioticoterapia. O paciente deve reter a urina na bexiga por no mínimo 2 horas antes de realizar a coleta. A permanência da urina na bexiga por pelo menos 4 horas é o ideal, pois diminui o número de resultados falso-negativos. Evitar a ingestão de líquidos em excesso, pois poderá diluir a urina, diminuindo a contagem de colônias ou gerando resultados falso-negativos. Nunca utilizar amostras de urina coletadas em comadres, papagaios ou armazenadas no saco coletor de pacientes sondados.

O transporte e armazenamento da amostra influenciam diretamente o resultado da cultura. A literatura atual sugere que a urina não deva permanecer mais que 30 minutos a temperatura ambiente após a coleta. Na impossibilidade de encaminhamento imediato ao laboratório de microbiologia, recomenda-se a refrigeração da amostra entre 2 °C e 8 °C, por um prazo máximo de 24 horas, ou o uso de meios de transporte/conservantes.

Uma alternativa para minimizar o efeito do tempo no transporte das amostras de urina, que pode ser utilizada em postos de coleta, é o laminocultivo (Figura 32.1). A metodologia é prática, porém a quantificação bacteriana fica prejudicada. Recomenda-se que o laboratório emita um laudo qualitativo ou semiquantitativo.

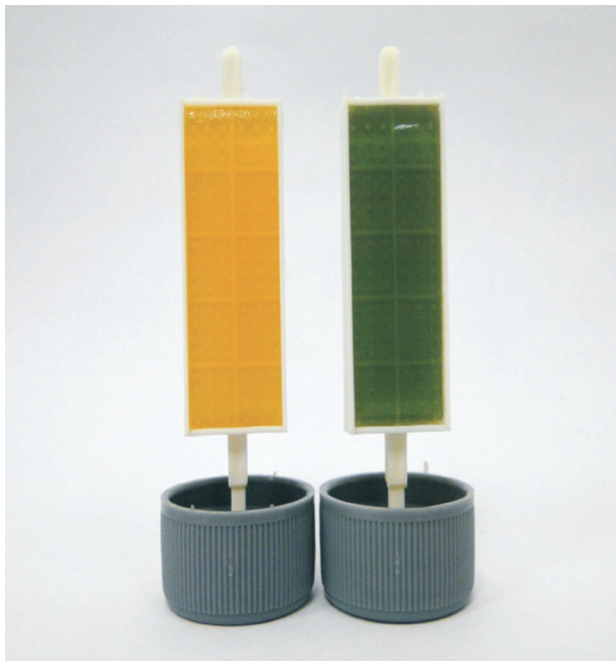


Figura 32.1 Laminocultivo utilizado para semeadura de amostras de urina.
Fonte: Albini; Souza; Silveira, 2012.

O laboratório clínico deve ter bem-definidos os critérios de rejeição de amostras de urina para uroculturas, por exem-

plo, amostras de urina de 24 horas, amostras coletadas há mais de 2 horas sem refrigeração, urinas coletadas em recipientes não estéreis, ponta de cateter de Foley, e amostras obtidas de bolsa coletora.

TESTES RÁPIDOS

Parâmetros do exame parcial de urina, como pesquisa de nitritos e detecção da enzima leucócitos esterase, bem como coloração de Gram, são testes rápidos que apresentam grande utilidade no diagnóstico diferencial e orientação terapêutica em suspeitas de ITU. No entanto, não devem substituir a urocultura, principalmente devido ao aumento na resistência aos antimicrobianos frequentemente utilizados para tratamento de ITUs.

A pesquisa de nitritos verifica a capacidade da bactéria de reduzir nitratos a nitritos, normalmente sugerindo infecção por enterobactérias. No entanto, urinas velhas podem originar reações falso-positivas. Além disso, em pacientes com dieta pobre em proteínas, pequeno tempo de retenção urinária ou em infecções por algumas bactérias Gram-positivas pode ocorrer resultados falso-negativos. Medicamentos que alteram a coloração da urina também podem interferir diretamente nesse teste.

O teste da leucócito-esterase é outro importante teste rápido, mas que não substitui a avaliação microscópica do sedimento urinário. Detecta dez ou mais leucócitos por campo microscópico de maior aumento (mil vezes), podendo ser utilizado como bom marcador de ITU. Porém, pacientes com bacteriúria assintomática, imunocomprometidos, neutropênicos e/ou sob uso de anti-inflamatórios podem apresentar resultados negativos. A presença de leucócitos pode ainda não estar relacionada à ITU, como por exemplo, na síndrome uretral aguda e glomerulonefrite.

A coloração de Gram permite ao laboratório emitir informações a respeito do morfotipo bacteriano, sendo útil na seleção da terapia empírica. Além disso, o Gram de urina não centrifugada permite uma correlação com o crescimento em cultura, a visualização de uma bactéria por campo com uma contagem de colônias ≥ 100.000 UFC/mL. Para realizar o Gram da urina não centrifugada recomenda-se homogeneizar bem a urina, retirar uma alíquota de 10 μL, colocar numa lâmina sem espalhar, deixando secar ao ar. O Gram da urina pode auxiliar na caracterização de amostras contaminadas durante a coleta, nas quais podem ser visualizados diferentes morfotipos bacterianos, muitos lactobacilos e/ou a presença de células epiteliais. Além disso, será útil para determinar a necessidade de tempo maior de incubação e/ou a utilização de meios de cultura mais nutritivos e atmosferas especiais.

Os testes rápidos apresentam sensibilidade e especificidade variáveis, são importantes instrumentos acessórios para o diagnóstico clínico de ITUs não complicadas, porém não devem ser utilizados de maneira isolada devido à possibilidade de resultados falso-positivos e negativos.

PROCESSAMENTO

Após a coleta adequada, a urina deve ser semeada em meios de cultura que permitam o crescimento dos principais microrganismos associados às ITU. Um meio classicamente utilizado em urocultura é o CLED (Cistina Lactose Eletrólito Deficiente), meio não seletivo e diferencial, devido à presença da lactose. Por ser nutricionalmente pobre, algumas espécies de estreptococos podem apresentar dificuldade de crescimento no CLED. Mas sua deficiência em eletrólitos evita a formação do "véu" característico de colônias de *Proteus*. Partindo do pressuposto de que, aproximadamente 80% das uroculturas positivas apresentam crescimento de enterobactérias, a utilização de um meio seletivo pode agilizar o fluxo de trabalho. O meio de cultura mais utilizado com este propósito é o ágar MacConkey, meio seletivo e diferencial, que permite o crescimento de bacilos Gram-negativos e a visualização da prova da lactose. Em algumas situações é interessante utilizar ágar sangue de carneiro a 5%, um meio nutricionalmente enriquecido, que apresenta como diferencial a evidenciação das reações hemolíticas, que possibilitam a correta caracterização de estreptococos e enterococos. Biplacas (Figura 32.2) com uma combinação desses meios: Mac Conkey, CLED e ágar sangue de carneiro são comuns nos laboratórios, estando comercialmente disponíveis.

Nos últimos anos, a utilização de meios cromogênicos tem possibilitado avanços no laboratório de microbiologia. É possível realizar a identificação definitiva ou presuntiva de microrganismos de acordo com a coloração apresentada no meio utilizado. Em uroculturas pode-se diminuir custos associados à identificação dos principais uropatógenos, facilitando e acelerando o fluxo de trabalho. Além disso, esses meios são muito úteis na identificação de culturas mistas (Figura 32.3).

Atualmente, a metodologia quantitativa que utiliza alças calibradas é a mais recomendada para culturas de urina. Usualmente, os laboratórios utilizam a alça de 1 μL, que permite o crescimento a partir de 1.000 UFC/mL. Em algumas situações, quantidade inferior a 1.000 UFC/mL pode ser clinicamente relevante, como em coletas por punção suprapúbica ou em paciente em uso de antimicrobianos. Nessas condições, deve-se aumentar a sensibilidade do teste utilizando-se alça de 10 μL, através da qual detectam-se crescimentos a partir de 100 UFC/mL. Procedimentos pré-analíticos bem-estabelecidos e funcionários capacitados devem garantir que informações importantes, como o tipo de amostra e características do paciente, cheguem ao setor técnico juntamente com a urina, possibilitando a semeadura adequada.

Durante o procedimento de semeadura, a alça deve ser introduzida na urina de forma perpendicular, até completa submersão, garantindo que o volume inoculado seja exato (Figura 32.4). Realiza-se a semeadura quantitativa, depositando-se a amostra através de uma estria central única, seguindo posteriormente com estrias transversais bem próximas para obtenção de colônias isoladas (Figura 32.5).

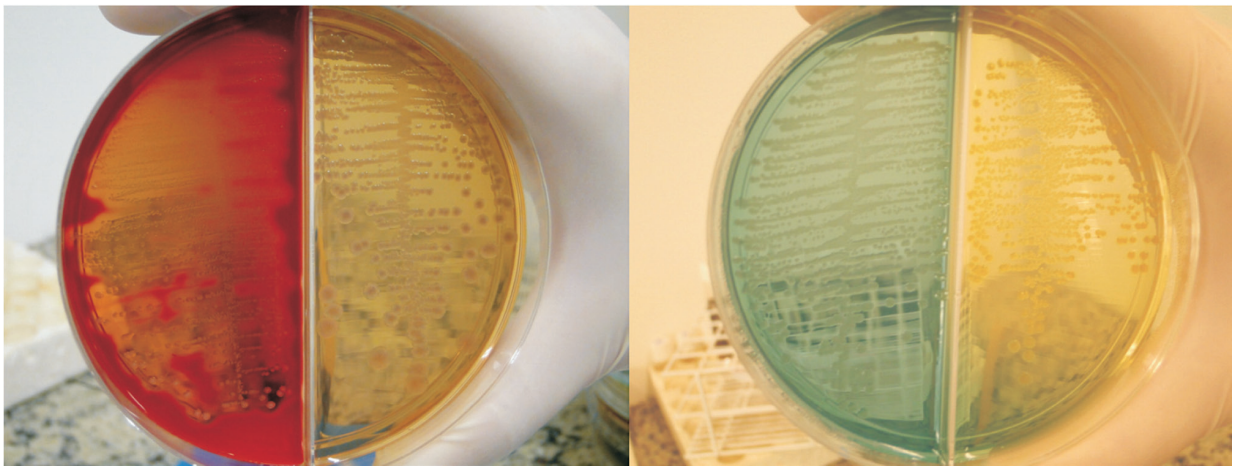


Figura 32.2 À esquerda, biplaca de ágar sangue de carneiro e Mac Conkey com crescimento de bactéria Gram-negativa hemolítica e não fermentadora da glicose. Na placa à direita, com meios Cled e Mac Conkey, verifica-se o desenvolvimento de bactéria Gram-negativa fermentadora da glicose.
Fonte: Albini, Souza, Silveira, 2012.

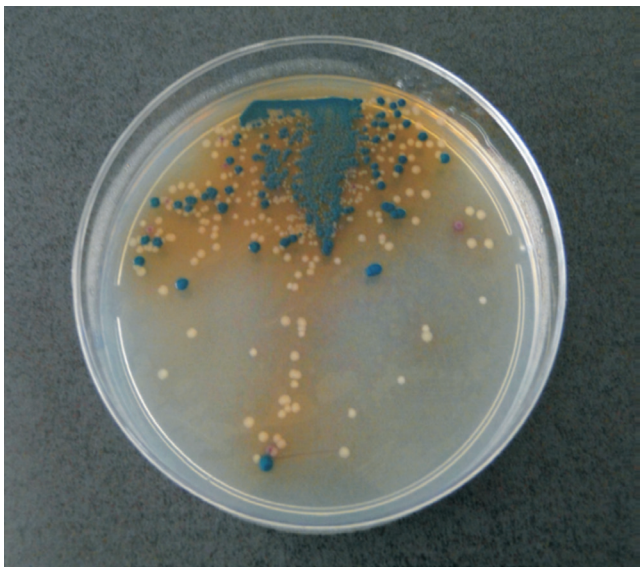


Figura 32.3 Ágar cromogênico demostrando crescimento de três diferentes microrganismos.
Fonte: Albini, Souza, Silveira, 2012.

Após semeadura, as placas devem ser incubadas a 35 °C por 18 a 24 horas. Alguns uropatógenos incomuns podem requerer incubação prolongada por até 72 horas, ou semeadura em meios enriquecidos e, ainda, incubação em atmosfera de microaerofilia (*Haemophilus influenzae*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Actinobaculum* spp.). Normalmente, o Gram da amostra irá determinar a necessidade de utilizar condições diferenciadas que permitam o crescimento de microrganismos fastidiosos. Recomenda-se refrigerar uma alíquota da urina no momento da semeadura.

Figura 32.4 Introdução de alça calibrada de 10 µL de forma adequada na amostra de urina.
Fonte: Albini, Souza, Silveira, 2012.

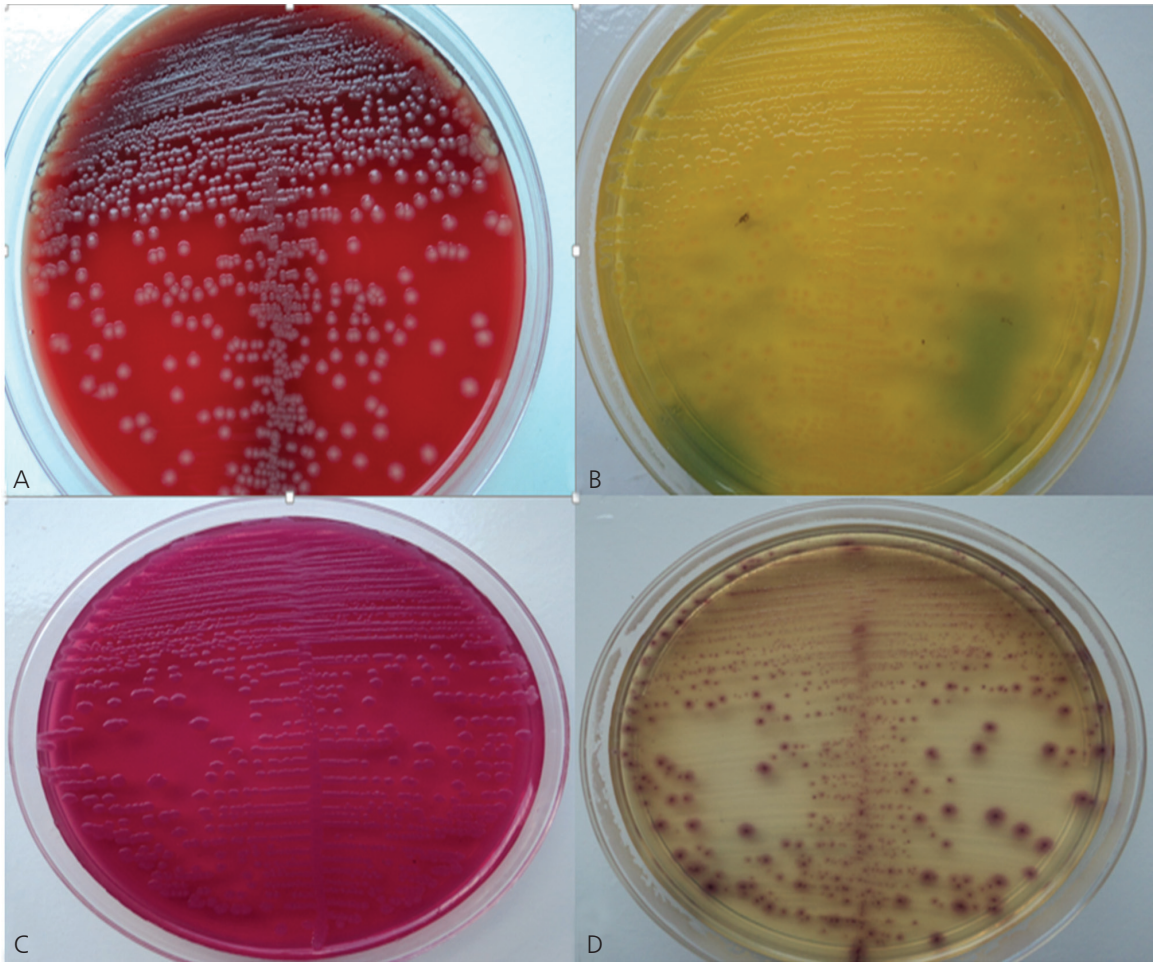


Figura 32.5 Crescimento de *Escherichia coli* nos meios comumente utilizados em uroculturas: **(A)** ágar sangue de carneiro; **(B)** ágar Cled; **(C)** ágar Mac Conkey; **(D)** ágar cromogênico.
Fonte: Acervo dos autores.

INTERPRETAÇÃO DE UROCULTURAS

Para garantir um resultado mais acurado, representativo do verdadeiro processo infeccioso no trato urinário, além dos cuidados essenciais durante a coleta, transporte e armazenamento da amostra, a análise da cultura deve ser criteriosa. Para isso, é importante considerar todas as informações disponíveis sobre o paciente e a amostra no momento da avaliação do crescimento bacteriano. Além disso, é recomendável que os laboratórios liberem os resultados das culturas com interpretações e comentários que possam auxiliar na avaliação do paciente, pois as informações contidas no laudo fornecerão subsídios para melhor conduta clínica.

A presença de leucocitúria/piúria e bacteriúria no sedimento urinário são fatores que auxiliam na determinação da presença de ITU. Ao analisar o crescimento bacteriano é funtamental avaliar a presença de leucócitos e de bactérias no exame parcial de urina (PU) e/ou na bacterioscopia, bem como a presença de leveduras, protozoários e/ou nitrito. A urocultura e o PU são análises realizadas na mesma amostra, portanto seus resultados devem ser compatíveis. Para isso, o profissional deve utilizar as informações obtidas no PU como ferramentas auxiliares na análise do crescimento bacteriano em cultura. Neste capítulo utilizaremos o conceito de leucocitúria para avaliação de uroculturas, como a presença ≥ 30.000 leucócitos/mL, sugerida por Oplustil e colaboradoras em 2010. No entanto, como trabalha-se com amostras biológicas obtidas espontaneamente pelo próprio paciente, esses leucócitos podem ter origem na contaminação da amostra com conteúdo vaginal, por exemplo. Nesta situação, 47.000 leucócitos/mL não serão significativos de ITU, e na análise do PU, bem como da bacterioscopia, provavelmente serão visualizadas muitas células do epitélio vaginal e lactobacilos, caracterizando a amostra como inapropriada. Por outro lado, bacteriúria pode ser relevante nas situações em que leucocitúria normalmente está ausente ou é mínima, na pre-

sença de infecções verdadeiras, como tuberculose renal, em pacientes neutropênicos, e em pacientes com câncer. Outra situação encontrada na rotina é a bacteriúria assintomática, que é caracterizada pela ausência de sinais clínicos de ITU associada a crescimento ≥ 100.000 UFC/mL da mesma espécie bacteriana. Em mulheres é necessária a coleta adequada de duas uroculturas consecutivas para definir bacteriúria assintomática, mas uma única detecção é suficiente para homens. O tratamento de bacteriúria assintomática é indicado somente em casos excepcionais como gestantes ou pacientes que serão submetidos a procedimentos urológicos. Segundo Renko e colaboradores, 2011, em pacientes diabéticos a bacteriúria assintomática tem sido associada à albuminúria e ao desenvolvimento de ITU sintomática.

É imprescindível que na análise das uroculturas sejam consideradas características inerentes ao paciente, a avaliação do crescimento bacteriano será diferente se a amostra for proveniente de uma criança ou de uma gestante, por exemplo. O critério estabelecido por Kass, em 1957, para diagnóstico de ITU por cultura de jato médio urinário, definido como o isolamento de ≥ 100.000 UFC/mL de um único uropatógeno, foi resultado de um estudo com 74 mulheres com pielonefrite aguda e 444 controles assintomáticos. Apesar do pequeno número de amostras, entre outras limitações do estudo, ainda há uma tendência a utilizar o ponto de corte de 100.000 UFC/mL para definir todas as ITUs, provavelmente devido à sua alta especificidade diagnóstica. De fato, a apresentação da cistite aguda não complicada, comum em mulheres imunocompetentes, sem comorbidades, sem anormalidades urológicas, não gestantes e pré-menopausa, se enquadra frequentemente nos critérios de Kass. Mas, seguindo as recomendações da Associação Europeia de Urologia, por exemplo, o diagnóstico de ITU não complicada pode ser feito a partir de contagens de colônias ≥ 1.000 UFC/mL de um uropatógeno em mulheres sintomáticas, e ≥ 10.000 UFC/mL de um uropatógeno para diagnóstico de pielonefrite não complicada, mostrando a baixa sensibilidade diagnóstica ao utilizar-se o critério de Kass.

A definição de um único ponto de corte para diagnosticar todas as ITUs é, portanto, questionável, devendo-se ter atenção especial para pacientes considerados de risco para ITU complicada como gestantes, pacientes com histórico de infeccção do trato urinário na infância, pré-adolescentes e pós-menopausa, imunocomprometidos, portadores de desordens metabólicas como *Diabetes mellitu*s, pacientes com anormalidades urológicas (cálculo, stents, cateteres, bexiga neurogênica...), além disso, infecções urinárias em homens geralmente são consideradas complicadas.

Nas gestantes ocorrem mudanças na anatomia e fisiologia do sistema geniturinário, que predispõem à ITU. Como citado por Palmeiro, 2012, o aumento da estrutura anatômica renal (ureteres, pelves e cálice), e uma redução do tônus muscular, devido aos elevados níveis de estrogênio e progesterona, podem causar refluxo vesicouretral e estase urinária. O aumento do fluxo plasmático renal e da taxa de filtração glomerular, a formação de hidroureter e hidronefrose, glicosúria e alcalose urinária são fatores fisiológicos que contribuem para ITU em gestantes. Essas mudanças impostas ao trato urinário, somadas a alterações nos mecanismos imunológicos de defesa que ocorrem durante a gestação, predispõem à transformação das bacteriúrias assintomáticas em infecções sintomáticas do trato urinário, portanto, bacteriúria assintomática deve ser sempre valorizada. Em pacientes gestantes com sintomas compatíveis com ITU são considerados relevantes crescimentos ≥ 1.000UFC/ml de um uropatógeno. Nessas pacientes as ITUs são associadas a intercorrências materno-fetais graves como abortamento, parto prematuro, morte fetal, retardo mental ou atraso no desenvolvimento.

Pacientes diabéticos têm o risco dobrado de desenvolver ITU. O motivo desse aumento ainda não está bem compreendido, embora disfunção na bexiga, que aumenta com a duração do diabetes, e glicosúria sejam mecanismos hipotéticos.

Pacientes idosos apresentam alterações funcionais e estruturais no trato geniturinário que poderiam explicar o aumento de ITUs. Como citado por Tuon, 2012, o aumento progressivo da próstata, bem como fibrose e obstrução uretral ou ureteral por neoplasia e nefrolitíase são mais frequentes em homens com idade avançada; e em mulheres, a atrofia da mucosa do trato urinário após a menopausa são alterações que facilitam a colonização bacteriana e aumentam o volume residual de urina na bexiga, aumentando o risco de ITU. Além disso, pacientes idosos podem apresentar uma condição crônica de sintomas do trato urinário baixo conhecida como LUTS *(lower urinary tract symptoms*), na qual os critérios de Kass são pouco confiáveis. (LUTS são um amplo grupo de sinais e sintomas que incluem urgência, frequência, e incontinência da bexiga hiperativa, problemas urinários como hesitação e intermitência, incontinência de esforço e dor, todos se sobrepondo variadamente). A prevalência de LUTS aumenta com a idade, e foi reportada em 40% dos homens e 28% das mulheres entre 70 e 79 anos de idade. Nessa condição, os microrganismos parecem estar no interior ou intimamente associados às células epiteliais, podendo inclusive não serem detectados nas culturas de rotina. Em uroculturas de pacientes idosos sintomáticos, baixas contagens bacterianas podem ser significativas de processo infeccioso. Nesses pacientes, a coleta paralela de hemocultura e urocultura pode melhorar o diagnóstico.

Os pacientes com cálculo urinário apresentam alta prevalência de ITU no momento do diagnóstico, sendo a maioria deles infectados por microrganismos produtores de urease. Essas enzimas transformam ureia em dióxido de carbono e amônia. A camada de glicosaminoglicana sofre injúria devido ao aumento da amônia, o que facilita a aderência bacteriana e promove a formação de critais de estruvita, que se agregam formando cálculos renais e incrustações nos cateteres urinários.

Outra informação indispensável para avaliar a urocultura e determinar o número de unidades formadoras de colônias, que deve ser considerado significativo, é baseada no método de coleta da urina. O Cumitech 2C, 2009, classifica os métodos de coleta como não invasivos (jato médio, cole-

tor pediátrico e paciente cateterizado), e invasivos (punção suprapúbica, cistoscopia, nefrostomia e cateter de alívio), e utiliza essa classificação para trabalhar os pontos de corte da contagem bacteriana por tipo de coleta (Tabela 32.1).

Na urina coletada por punção suprapúbica, qualquer contagem de colônia é significativa e um volume maior de urina deve ser semeado (10 µL) para aumentar a sensibilidade. Por outro lado, pacientes com cateter de longa duração sempre apresentarão bacteriúria por uma ampla variedade de microrganismos, devido à formação de biofilme ao longo do cateter. Nesses pacientes, a urocultura deveria ser coletada somente na presença de sintomas, como febre de origem desconhecida, dor no flanco, hematúria aguda, desconforto pélvico, sempre antes do início da antibioticoterapia. O biofilme nos cateteres é formado inicialmente por uma única espécie de microrganismo, tornando-se polimicrobiano ao longo do tempo. É comum encontrar mais de três espécies de microrganismos nessas amostras, o que dificulta a análise e a conduta clínica, e alguns autores sugerem que tais uroculturas não devam ser continuadas. Para amenizar o problema, recomenda-se a substituição do cateter antes da coleta de urocultura sempre que o mesmo estiver presente há duas semanas ou

Tabela 32.1 Procedimentos recomendados para seguimento das uroculturas considerando o tipo de coleta, o número de isolados e a contagem de colônias.

Coleta Não Invasiva: volume semeado 1 µL			
Incubação	**N° isolados**	**Contagem de colônias (UFC/mL)**	**Procedimento recomendado**
Mínimo 16h a 18h	1	< 10.000 ≥ 10.000	ID mínima ID e TSA (se apropriado)
	2	2 < 10.000 2 ≥ 10.000 1 <10.000 1 ≥ 10.000	ID mínima ID e TSA (se apropriado) ID mínima (do isolado <10.000) ID e TSA do isolado ≥ 10.000 (se apropriado)
	≥ 3	1 isolado ≥ 100.000 2 isolados <10.000 Outros arranjos	ID e TSA do isolado ≥ 100.000 (se apropriado) ID mínima (dois isolados <10.000) ID mínima de todos os isolados Liberar a observação de múltiplas morfologias bacterianas e sugerir nova coleta
Coleta Invasiva: volume semeado 10 µL			
Incubação	**N° isolados**	**Contagem de colônias (UFC/mL)**	**Procedimento recomendado**
Mínimo 48h*	1	< 1.000 ≥ 1.000	ID mínima ID e TSA (se apropriado)
	2	2 < 1.000 2 ≥ 1.000 1 <1.000 1 ≥ 1.000	ID mínima ID e TSA (se apropriado) ID mínima (do isolado <10.000) ID e TSA do isolado ≥ 10.000 (se apropriado)
	≥ 3	1 isolado ≥ 10.000 e 2 isolados <1.000 Outros arranjos	ID e TSA do isolado ≥ 10.000 (se apropriado) ID mínima (dois isolados <1.000) ID mínima de todos os isolados Liberar a observação de múltiplas morfologias bacterianas e sugerir nova coleta

UFC/mL: Unidades formadoras de colônias por militro; ID: identificação; TSA: antibiograma.

Fonte: Adaptada de Cumitech 2C.

mais, assim a amostra coletada através do novo cateter fornecerá urina da bexiga, sem influência direta do biofilme; além disso, a substituição do cateter também melhora os resultados clínicos. A coleta de hemocultura paralelamente à urocultura também é um procedimento recomendado para auxiliar no diagnóstico.

Outro tipo de amostra que requer muita atenção é a urina infantil obtida por coleta não invasiva. Urinas de crianças de até dois anos de idade são facilmente contaminadas durante o procedimento de coleta. Couthard e colaboradores, 2010, mostraram que o crescimento de um único uropatógeno, como *Escherichia coli*, em uma contagem > 100.000 UFC/mL, pode ocorrer por contaminação da amostra, não se repetindo em uma segunda coleta (Figura 32.6). Al-Orifi e colaboradores, 2000, avaliando 7.584 culturas de urina de crianças com menos de dois anos de idade obtiveram 62,8% de contaminação em urinas coletadas com saco coletor. Karacan e colaboradores, em 2010, avaliando 1.067 uroculturas, obtiveram 43,9% de contaminação. Esses autores consideram que a urocultura coletada por saco coletor só tem valor quando não apresenta crescimento bacteriano (alto valor preditivo negativo). Uroculturas positivas coletadas em sacos coletores, mesmo aquelas com um único patógeno, deveriam ser confirmadas por uma segunda coleta, preferencialmente por cateter de alívio ou punção suprapúbica. A utilização de sacos coletores para urinas infantis aumenta os riscos de resultados clínicos adversos, como atraso no diagnóstico e tratamento, e, ainda, tratamento e hospitalização desnecessários. Para pacientes pediátricos considerados de alto risco, devido à ITU recorrente, refluxo ou função renal comprometida, a recomendação é de que a coleta de urina seja feita somente por cateterismo vesical.

Segundo Kass, ITU é causada por um único uropatógeno, no entanto, considerar que infecções urinárias não podem envolver mais que uma espécie de microrganismo é outro critério que tem sido questionado. O trato urinário feminino é rotineiramente exposto a uma diversidade de microrganismos, translocados da biota periuretral, vaginal ou gastrointestinal por atividade física como um intercurso sexual, e essa microbiota é inerentemente polimicrobiana. É possível, portanto, que mais de um microrganismo esteja envolvido no processo infeccioso, tornando um desafio para a rotina diferenciar infecção de contaminação da amostra durante a coleta. Como foi mostrado na Tabela 32.1 (Cumitec 2C), a presença de três ou mais uropatógenos para uma urina por coleta não invasiva, geralmente não deve ser valorizada. A terceira edição do *Clinical Microbiology Procedures Handbook* utiliza, além da metodologia de coleta, algumas informações sobre o paciente para auxiliar na determinação de quais pontos de corte de crescimento bacteriano devem ser considerados significativos na avaliação da urocultura (Tabela 32.2). As Tabelas 32.1 e 32.2, mostram que a presença de três ou mais uropatógenos está fortemente associada a problemas na obtenção da amostra e, em geral, só deve ser considerada por solicitação clínica ou quando a urina for obtida por metodologia invasiva.

Uropatógenos

Os agentes etiológicos de ITUs são geralmente provenientes da microbiota intestinal do próprio paciente, com *Escherichia coli, Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., e *Proteus* spp., representando a maioria dos isolados, tanto de pacientes hospitalizados como ambulatoriais. *Staphylococcus saprophyticus* é um uropatógeno frequente em mulheres em idade fértil. *Streptococcus agalactiae* é um importante patógeno em gestantes e pacientes diabéticos. Em gestantes deve ser reportado em qualquer contagem, mesmo em amostras com crescimento concomitante de microbiota urogenital, visto que o relato da colonização por esse microrganismo é significativo para essas pacientes. *Pseudomonas aeruginosa* é associada a infecções urinárias especialmente em pacientes hospitalizados. *Staphylococcus aureus*, apesar de ser incomum, é

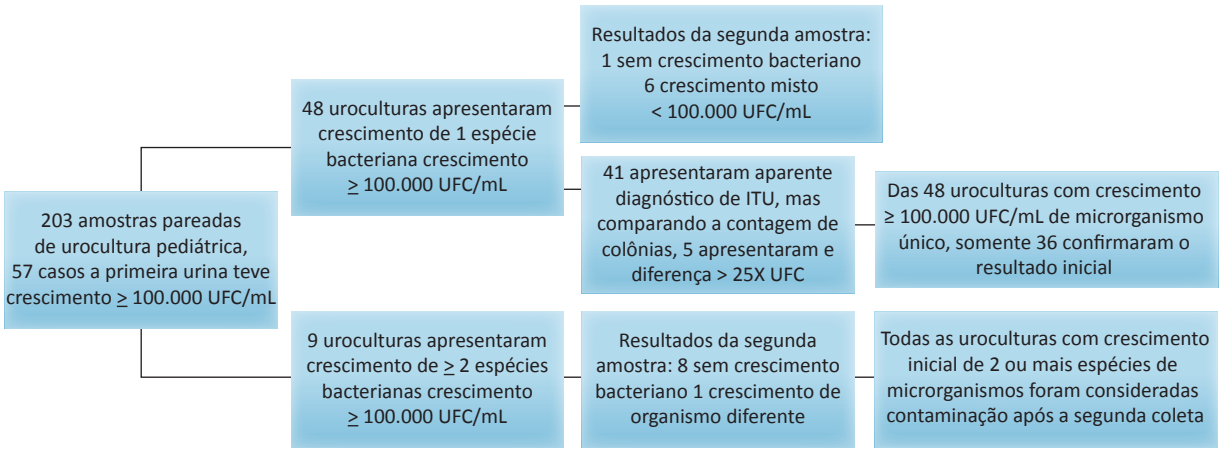


Figura 32.6 Fluxograma mostrando resultados de uroculturas pareadas de amostras de urina de 203 crianças para diagnóstico de ITU.
Fonte: Adaptada de Coulthard, 2010.

Tabela 32.2 Procedimentos recomendados para seguimento das uroculturas considerando o tipo de coleta, dados do paciente, número de isolados, e contagem de colônias.

Tipo urina	Volume inoculado	1 uropatógeno	2 uropatógenos	≥ 3 uropatógenos	Tempo de incubação
Jato médio, paciente ambulatorial < 65 anos	1 μL (0,001 mL)	< 10.000 UFC/mL = ID mínima ≥ 10.000 UFC/mL = ID +TSA ≥ 1.000 UFC/mL mulheres entre 14 e 30 anos = ID + TSA	Para cada patógeno < 100.000 UFC/mL ID mínima ≥ 100.000 UFC/mL ID + TSA	Reportar contagem de colônias + "presença de múltiplos morfotipos bacterianos, sugere-se nova coleta se clinicamente indicado"	Mínimo 18h
Pacientes com cateter, jato médio de pacientes > 65 anos ou internados	1 μL (0,001 mL)	< 10.000 UFC/mL = ID mínima ≥ 10.000 UFC/mL = ID +TSA	Para cada patógeno < 100.000 UFC/mL ID mínima ≥ 100.000 UFC/mL ID + TSA	Se jato médio ou cateter sem leucócitos, reportar como descrito acima ou entrar em contato para determinar se paciente sintomático; ou se a coleta foi por passagem de sonda vesical; se sim, proceder igual 2 uropatógenos; ou ID mínima de cada uropatógeno com a nota "contatar o laboratório se identificação definitiva for clinicamente indicada	Mínimo 36h
Sonda de alívio, punção supra- púbica, cistoscopia, nefroscopia	10 μL (0,01 mL)	100 a 1.000 com presença de biota urogenital ou de pele = ID mínima ≥ 1.000 UFC/mL ou qualquer contagem para cultura pura de uropatógeno = ID + TSA	Para cada patógeno < 1.000 UFC/mL ID mínima ≥ 1.000 UFC/mL ID + TSA	Para cada patógeno < 10.000 UFC/mL ID mínima; ≥ 10.000 UFC/mL ID + TSA Ou contatar o clínico para determinar o fluxo de trabalho	Mínimo 48h

UFC/mL: Unidades formadoras de colônias por militro; ID: identificação; TSA: antibiograma.

Fonte: Adaptada de Garcia, 2010.

isolado em ITUs decorrentes de bacteriemia ou em pacientes cateterizados. Outros uropatógenos considerados não usuais são *Corynebacterium urealyticum, Aerococcus* spp., e *Haemophilus influenzae* (Cumitec, 2009). Entre as leveduras, *Candida albicans* e *C. glabrata* são as espécies uropatogênicas mais comuns.

A identificação mínima sugerida nas Tabelas 32.1 e 32.2 pode ser feita por utilização de meios cromogênicos (altamente recomendado) ou através da realização de testes mínimos, como mostra a Tabela 32.3.

Infelizmente, a urina pode ser contaminada facilmente com microbiota do períneo, próstata, uretra ou vagina no momento da coleta. Fazem parte da microbiota urogenital e da pele, e, portanto, devem ser considerados prováveis contaminantes, estreptococo do grupo viridans, estafilococo coagulase negativa (exceto *S. saprophyticcus*), BGP difteroides, *Neisserias* spp., e *Lactobacillus* spp. Para o fluxo de trabalho proposto neste capítulo, o crescimento de microbiota urogenital e/ou da pele dez vezes menor do que o de uropatógenos deve ser ignorado. Se o crescimento dessa microbiota for igual ao de uropatógenos, recomenda-se liberar: desenvolvimento de várias espécies bacterianas, provável contaminação, sugerindo nova coleta se clinicamente indicado. O crescimento de um único microrganismo da microbiota urogenital, como estreptococo do grupo viridans ou estafilococos coagulase negativa deve ser avaliado criteriosamente. Em geral, recomenda-se solicitar uma nova coleta para confirmar o crescimento. Especialmente em pacientes imunocomprometidos, esses microrganismos podem causar ITU, *Staphylococcus epidermidis,* por exemplo, apresenta capacidade de permanecer viável em tecidos necróticos com infarto renal e em enxerto não funcionante, levando a ITU de difícil tratamento.

Escherichia coli uropatogênica (EPEC) invade as células uroteliais durante a ITU aguda, formando um reservatório intracelular, que possibilita a evasão dos antibióticos e do sistema imunológico, permitindo a recorrência da infecção. Outras espécies bacterianas como *S. saprophyticus* e *Klebsiella pneumoniae* também apresentaram capacidade de invasão urotelial em modelos de ITU experimentais. Horsley e colaboradores, 2013, demonstraram a ocorrência de *Enterococcus faecalis* no interior de células uroteliais da bexiga de pacientes com LUTS, e estes isolados foram capazes de invadir células *in vitro*, confirmando a importância deste uropatógeno no LUTS, e consequentemente no paciente idoso.

A associação entre algumas espécies de microrganismos pode aumentar seu potencial patogênico. Kline e colaboradores, 2012, relataram que a presença de *Streptococcus* do grupo B levou a um aumento na quantidade de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) no lúmen da bexiga e reduziu a

Tabela 32.3 Identificação mínima de microrganismos isolados em urocultura.

Reportar	Testes Mínimos
ID presuntiva *E. coli*	Crescimento de colônias típicas, lactose positiva, indol positivo e oxidase negativa
ID presuntiva *P. aeruginosa*	Crescimento de colônias típicas, lactose negativa, oxidase positiva, com odor de *Pseudomonas*. Pode ser inoculado em IAL, TSI ou OFglicose para distinguir de enterobactérias
Bacilo Gram-negativo	BGNs que não se enquadram nos critérios acima
Levedura	Morfologia consistente com leveduras a fresco ou Gram da colônia
S. *aureus*	CGP, catalase positiva, coagulase positiva
Staphylococcus coagulase negativa	CGP, catalase positiva, coagulase negativa, a exclusão de *S. saprophyticus* pode ser feita pelo disco de novobiocina*
Enterococcus spp.	CGP, catalase negativa, não hemolítico, PYR positivo. NaCl 6% e bile esculina podem ser utilizados
Estreptococo do grupo *Viridans*	CGP aos pares e em cadeias, catalase negativa, α-hemolítico, PYR negativo. Excluir *Aerococcus,* que se apresentam como tétrades ou cachos no Gram
Lactobacillus spp.	BGP, α-hemolítico, catalase negativo
Corynebacterium spp.	BGP, catalase positiva.

ID: identificação; IAL: meio Instituto Adolfo Lutz ou Pessoa e Silva; TSI: triplice açúcar e ferro; OF: meio de oxidação e fermentação; BGN bacilo Gram-negativo; CGP: coco Gram-positivo; PYR: pyrrolidoyl-aminopeptidase; BGP: bacilo Gram-positivo.

Existem sete espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa resistentes a novobiocina, recomeda-se liberar *Staphylococcus* do grupo *saprophyticus.*

Fonte: Adaptada de Garcia, 2010.

resposta inflamatória durante a infecção aguda em murinos, e que esta exposição polimicrobiana pode ser um fator de risco para pielonefrite crônica e ITU recorrente em grupos suscetíveis.

Diagnóstico de infecção do trato urinário por leveduras

Infecções por leveduras podem ocorrer em pacientes imunocomprometidos, mas são mais frequentes em pacientes diabéticos e em pacientes com cateter ou *stents*, nos quais a remoção do cateter é normalmente necessária. As leveduras são detectadas normalmente pelas técnicas de urocultura de rotina, com exceção da *Candida glabrata*, que apesar de crescer bem em ágar sangue, cresce lentamente, podendo levar mais que 48 horas. Assim, a observação de leveduras no PU ou na bacterioscopia pode indicar a necessidade de um tempo maior de incubação da urocultura. O primeiro indício de infecção fúngica pode ser a presença de leveduras na bacterioscopia, a coloração de Gram da urina centrifugada é a amostra ideal. *Candida albicans* e outras menos comuns, como *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, podem aparecer como leveduras em brotamentos de 4 a 10 µm de diâmetro, e geralmente apresentam elementos de hifas. Leveduras menores, 2 a 4 µm de diâmetro, sem a presença desses elementos, são provavelmente *C. glabrata*. A presença de *pseudo-hifas* em urina não pode ser utilizada como marcador para distinguir infecção de contaminação. Outros organismos como *Rhodotorula, Trichosporon asahii* e *Blastoschizomyces capitus* têm sido associados a infecções disseminadas em pacientes imunocomprometidos, podendo aparecer na urina devido a fungemia. *T. Asahii* pode ser causa de ITU sintomática em transplantados renais. *Cryptococcus neoformans* pode estar presente na urina como manifestação de infecção disseminada.

A quantificação do número de colônias parace não ser muito útil no diagnóstico de UTIs por leveduras. Em estudos da década de 1970, que compararam cultura quantitativa de urina com o crescimento da levedura em biópsia renal para paciente sem cateteres, a infecção renal comprovada foi observada com baixas contagens de colônias (10.000 UFC/mL), já para pacientes com cateteres de longa duração não houve correlação entre a contagem de colônias e a infecção renal. Nos pacientes cateterizados contagens baixas como 20.000 UFC/mL podem indicar infecção, enquanto crescimentos ≥ 100.000 UFC/mL podem indicar colonização.

Recomendações para análise e interpretação de uroculturas

Culturas sem crescimento bacteriano

Após 18 a 24 horas de incubação, a ausência de crescimento bacteriano, associada a baixa contagem de leucócitos (< 30.000/mL) e microbiota escassa ou discreta, deve ser interpretada como cultura negativa. Amostras coletadas por punção suprapúbica ou sondas de alívio devem ser incubadas por até 48 horas.

Reportar o resultado como: sem crescimento bacteriano ≥ 1.000 UFC/mL/ ou ≥ 100 UFC/mL, conforme o volume utilizado.

No entanto, a ausência de crescimento bacteriano, após 18 a 24 horas de incubação, associada à leucocitúria (> 30.000/mL) e/ou microbiota moderada ou intensa ou, ainda, presença de leveduras ou nitrito positivo, deve ser mais bem avaliada com a realização de bacterioscopia do sedimento urinário (recomenda-se armazenar uma alíquota de urina sob refrigeração no momento da semeadura):

Procedimentos sugeridos após a bacterioscopia

a) Bactérias não visualizadas, muitos leucócitos (> 100.000/mL): reincubar a placa por mais 24 horas a 35 ± 2 ºC e semear 10 µL da alíquota de urina refrigerada em ágar sangue, incubando-a juntamente com a primeira.
Nota: a presença de muitos leucócitos com bactérias não visualizadas pode ser decorrente de infecção por clamídia, gonococo, micoplasma, ureaplasma, tricomonas, *Mycobacterium tuberculosis* ou *Leptospira*, causada por desidratação, pneumonia ou sepse, por condições clínicas não infecciosas como cálculos ou, ainda, paciente em uso de antibiótico.

b) Em uroculturas de mulheres a presença de bacilos Gram-positivos próprios da biota vaginal ou de bacilos Gram-positivos e negativos pleomórficos é sugestiva de contaminação da amostra com conteúdo vaginal durante a coleta; neste caso, o resultado da bacterioscopia deve ser liberado, sugerindo-se nova coleta a critério clínico. Normalmente nessas amostras é observado crescimento misto de espécies que não são consideradas uropatogênicas, que podem ser liberados como "Crescimento de microbiota urogenital" seguido da contagem de colônias.

c) Na presença de bacilos Gram-negativos, cocos Gram-positivos, bacilos Gram-positivos corineformes ou leveduras deve-se reincubar a placa a 35 ± 2 ºC por mais 24 horas, e semear 10 µL da alíquota de urina refrigerada em ágar sangue, incubando-a juntamente com a primeira. Em urinas pediátricas, a visualização de Bacilos Gram-negativos curtos pode indicar a presença de *Haemophilus influenzae*; neste caso, a urina deve ser semeada em ágar chocolate e incubada em CO_2. Amostras com leucocitúria e hematúria, especialmente em pacientes idosos, com presença de bacilos Gram-positivos corineformes, devem ser incubadas por até 72 horas. *Corynebacterium urealyticum* é um importante uropatógeno, geralmente associado a urinas alcalinas, com possibilidade de aparecimento de cristais de fosfato amoníaco magnesiano. Culturas negativas em amostras com leucocitúria e presença de bactérias no Gram podem indicar a presença de bactérias anaeróbias. A visualização de bactérias com parede celular deficiente, conhecidas como forma-L bacteriana (Figura 32.7), em geral indica exposição

bacteriana a antimicrobianos que atuam em parede celular. O antimicrobiano inibe a síntese de peptideoglicano, principal componente da parede celular, mas em urinas hipertônicas pode não ocorrer a lise da bactéria, levando ao aparecimento de microrganismos com parede celular deficiente. O pH ácido favorece a viabilidade dessas formas bacterianas, independentemente da concentração da urina. As bactérias permanecem viáveis no sistema urinário devido às condições apropriadas, mas podem não crescer ou apresentar crescimento escasso nos meios de cultura utilizados.

Culturas com crescimento bacteriano

Ao examinar a superfície do ágar deve-se quantificar os tipos morfológicos de microrganismos presentes. Utilizando a alça de 1 µL (0,001 mL) uma colônia equivale a 1.000 UFC/mL. Quando são observadas mais do que 100 colônias, sugere-se liberar crescimento > 100.000 UFC/mL. Ao utilizar a alça de 10 µL (0,01 mL), uma colônia equivale a 100 UFC/mL, na observação de mais do que 100 colônias, sugere-se liberar crescimento > 10.000 UFC/mL.

Sugestão de fluxo de trabalho para urinas com crescimento bacteriano:

Crescimento de um único tipo de microrganismo uropatogênico

- Crescimento ≤ 10.000 UFC/mL:
  - Urina de jato médio de paciente ambulatorial ou coletor pediátrico, deve-se realizar identificação mínima do microrganismo.

  Reportar o resultado: desenvolvimento de *Enterococcus* spp.
  Contagem de colônias: 6.000 UFC/mL.
- Deve-se ter atenção com:
  - Pacientes especiais como gestantes, idosos (especialmente aqueles atendidos em emergência ou hospitalizados), imunossuprimidos, renais crônicos ou diabéticos; nesses casos deve-se identificar o microrganismo e realizar TSA. É recomendável liberar uma observação sugerindo nova coleta a critério clínico.
  - Pacientes com numerosos leucócitos ou sabidamente sintomáticos; recomenda-se identificar o microrganismo e realizar o TSA.
  - Urinas obtidas por punção suprapúbica, sonda de alívio, cistoscopia, nefroscopia ou culturas para leveduras, realizar identificação do uropatógeno e TSA.

NOTA 1

A realização de bacterioscopia do sedimento urinário nessas amostras possibilita verificar a presença de contaminação durante a coleta (presença de biota vaginal por exemplo). Se houver evidências de contaminação, liberar o resultado da bacterioscopia, realizar a ID mínima e sugerir nova coleta a critério clínico.

- Crescimento 10.000 a 100.000 UFC/mL:
  - Urina de jato médio de paciente ambulatorial com leucocitúria (> 30.000 leucócitos/mL), realizar identificação e TSA do microrganismo.

  Reportar o resultado: desenvolvimento de *Enterococcus faecalis.*
  Contagem de colônias: 50.000 UFC/mL
  TSA
  - Urina de jato médio sem leucocitúria (< 30.000 leucócitos/mL), realizar bacterioscopia do sedimento urinário para verificar presença de contaminação:

  Evidências de contaminação liberar ID mínima, o resultado da bacterioscopia e sugerir nova coleta.
  Reportar o resultado: desenvolvimento de *Enterococcus* spp.
  Contagem de colônias: 50.000 UFC/mL

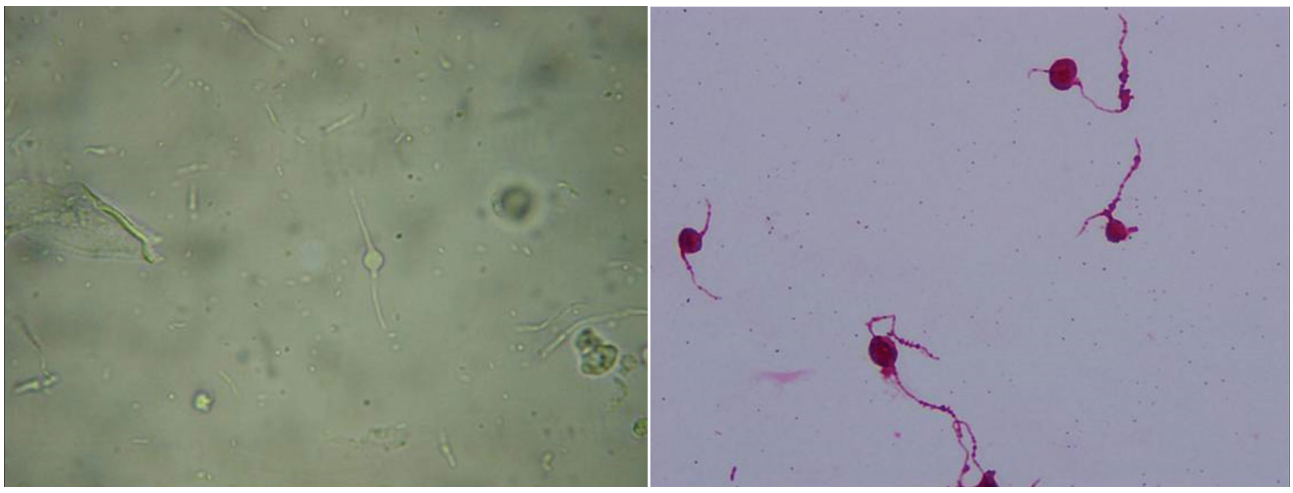


Figura 32.7 Bactérias com parede celular deficiente, exame direto à esquerda e coloração de Gram à direita.
Fonte: Ito, 2012.

Bacterioscopia: presença de muitos bacilos Gram-positivos próprios da biota vaginal, raros cocos Gram-positivos.
Observação: sugerimos nova coleta a critério clínico.
- Na ausência de contaminação, realizar ID + TSA e sugerir nova coleta.

- Deve-se ter atenção especial com:
  - Pacientes especiais como gestantes, idosos (especialmente aqueles atendidos em emergência ou hospitalizados), imunossuprimidos, renais crônicos ou diabéticos; nesses casos deve-se identificar o microrganismo e realizar TSA. É interessante liberar uma observação sugerindo nova coleta a critério clínico.
  - Urinas de coletor, realizar ID mínima e sugerir nova coleta a critério clínico. Na presença de leucocitúria, entrar em contato com o clínico, informando o resultado e sugerindo nova coleta devido à possibilidade de contaminação. Na impossibilidade de contato, uma alternativa é liberar a ID com a contagem de colônias e deixar o TSA disponível no laboratório, liberando a observação: contatar o laboratório se o TSA for clinicamente indicado, sugerindo nova coleta a critério clínico devido à possibilidade de contaminação da amostra durante a coleta.
- Crescimento ≥ 100.000 UFC/mL:
  Realizar Identificação do microrganismo + TSA
  Reportar o resultado: desenvolvimento de *Enterococcus faecalis.*
  Contagem de colônias: > 100.000 UFC/mL
  TSA
- Deve-se ter atenção especial com:
  - Urinas de crianças sem leucocitúria (< 30.000leucócitos/mL), obtidas com coletor urinário. Solicitar a coleta de uma segunda amostra, para confirmar o resultado.
  - Urina de jato médio de paciente ambulatorial não gestante sem leucocitúria, recomenda-se verificar o histórico da paciente, se esta for a primeira amostra com estas caracteristicas: bacteriúria sem leucocitúria, recomeda-se liberar uma observação sugerindo nova coleta a critério clínico.

Crescimento de dois tipos de uropatógenos:

- Crescimento < 100.000 UFC/mL para os dois uropatógenos
  - Urina jato médio de paciente ambulatorial sem leucocitúria, recomenda-se realizar identificação mínima e sugerir nova coleta a critério clínico.
  - Na presença de leucocitúria ou para pacientes especiais, recomenda-se considerar como ponto de corte crescimentos > 10.000 UFC/mL e fazer ID e TSA dos microrganismos acima desta contagem.
- Crescimento de um dos uropatógenos > 100.000 UFC/mL
  - Realizar ID e TSA do microrganismo com contagem superior a 100.000 UFC/mL e somente ID mínima do patógeno com crescimento inferior a 100.000 UFC/mL.
- Crescimento de dois uropatógenos ≥ 100.000 UFC/mL
  Realizar ID e TSA dos dois microrganismos.

NOTA 2

Realizar e liberar a bacteriscopia do sedimento urinário.

- Deve-se ter atenção especial com:
  - Amostra proveniente de coletor sem leucocitúria, liberar como desenvolvimento de duas espécies bacterianas, provável contaminação e sugerir nova coleta a critério clínico, mesmo em crescimentos > 100.000 UFC/mL.
  - Presença de numerosos leucócitos, sem indícios de contaminação e com crescimento de uropatógenos realizar e liberar ID + TSA dos dois tipos de microrganismos, independentemente da contagem.
  - Gestantes, pacientes idosos ou imunossuprimidos, que apresentarem baixas contagens de colônias, recomenda-se entrar em contato com o clínico para determinar se paciente é sintomático, ou realizar ID e deixar o TSA disponível no laboratório, liberando a observação: contatar o laboratório se o TSA for clinicamente indicado, sugerindo nova coleta a critério clínico.

Crescimento ≥ 3 tipos de uropatogenos

Realizar bacterioscopia do sedimento urinário sempre.
- Urinas sem leucocitúria recomenda-se reportar: desenvolvimento de várias espécies bacterianas, provável contaminação, liberando a contagem total de microrganismos/mL, e sugerindo nova coleta a critério clínico.
- Urinas com leucocitúria, recomenda-se entrar em contato com o médico para verificar como a amostra foi coletada e se o paciente está febril ou sintomático, determinando com o clínico a necessidade de realizar ID e TSA de uropatógenos. Em casos com contagens de leucócitos muito altas e dificuldade de localizar o médico responsável, realizar ID e deixar o TSA disponível no laboratório, liberando a observação: contatar o laboratório se o TSA for clinicamente indicado, sugerindo nova coleta a critério clínico

- Deve-se ter atenção especial com:
  - Gestante, pacientes idosos (especialmente atendido na emergência ou internado) e imunossuprimidos com crescimento de um tipo predominante (> 80%), recomenda-se fazer ID + TSA do patógeno predominante e ID mínima dos demais patógenos. Liberar observação de possível contaminação, sugerindo nova coleta se clinicamente indicado.

ANTIBIOGRAMA OU TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

O antibiograma de isolados urinários apresenta algumas características especiais. Por se tratar de um sítio anatômico diferenciado, os fármacos que potencialmente podem ser utilizados para terapêutica e, obrigatoriamente, necessitam apresentar boas taxas de excreção renal, já que precisam atingir o trato urinário para realizar sua ação farmacológica.

Em razão de características farmacocinéticas, alguns fármacos atingem altas concentrações urinárias e algumas vezes podem inibir o crescimento bacteriano, mesmo com o microrganismo não apresentando sensibilidade *in vitro*. A explicação para o fato é que o antibiograma, em geral, leva em consideração para determinação dos pontos de corte, as concentrações séricas do fármaco em regime posológico usualmente utilizado e não as concentrações nas vias urinárias. Por outro lado, devido a essas características farmacocinéticas, alguns fármacos não devem ser reportados em isolados urinários por não atingirem concentrações adequadas, como tigeciclina, cloranfenicol, eritromicina e clindamicina.

A escolha de quais fármacos devem ser testados pode variar de acordo com características particulares de cada região, tipo de serviço (clínicas pediátricas, obstétricas, geriátricas, hospitalares), preferências pessoais dos clínicos, e também disponibilidade dos discos comerciais. Porém, o antibiograma deve ser representativo, testando diversas classes de antimicrobianos, oferecendo uma gama maior de alternativas terapêuticas.

Protocolos internacionais com critérios interpretativos para realização e liberação do antibiograma estão disponíveis (CLSI/EUCAST). Cabe ao microbiologista, em conjunto com os clínicos, com a farmácia e a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, no caso de laboratórios hospitalares, escolher aquele que melhor se adapte às suas necessidades. A Tabela 32.4 apresenta uma sugestão de antimicrobianos que podem ser testados para as principais bactérias isoladas de uroculturas.

Tabela 32.4 Antimicrobianos testados em bactérias isoladas de uroculturas.

Enterobactérias	*S. saprophyticus*	Enterococos	*P. aeruginosa*
Ácido nalidíxico	Norfloxacino	Ampicilina	Ceftazidima
Norfloxacino	Ciprofloxacino	Ciprofloxacino	Cefepime
Ciprofloxacino	Nitrofurantoína	Norfloxacino	Gentamicina
Amoxicilina/ácido clavulânico	Sulfazotrim	Nitrofurantoína	Ciprofloxacino
Cefalotina		Fosfomicina	Imipenem
Ceftriaxona	*Staphylococcus* spp.	Vancomicina	Meropenem
Cefepime	Além dos discos acima, testar:		Piperacilina/ Tazobactam
Gentamicina	Cefalotina		Aztreonam
Nitrofurantoína	Cefoxitina		Amicacina
Ertapenem	Gentamicina		
Meropenem ou Imipenem			
Sulfazotrim			
Fosfomicina *			

*Testar somente em isolados de *Escherichia coli*.

Fonte: Acervo dos autores.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Al-Orifi F, McGillivray D, Tange S, et al. Urine culture from bag specimens in young children: are the risks too high? J Pediatr. 2000;137(2):221-6.
2. Burd EM, Kehl KS. A critical appraisal of the role of the clinical microbiology laboratory in the diagnosis of urinary tract ifections. J Clin Micriobiol. 2011;49(9):S34
3. Colgan R, Williams M. Diagnosis and treatment of acute uncomplicated cystitis. Am Fam Physician. 2011;84(7):771-6.

4. Coulthard MG, Kalra M, Lambert HJ, et al. Redefining urinary tract infections by bacterial colony counts. Pediatrics. 2010;125(2):335-41.
5. Coyne KS, Sexton CC, Thompson CL, et al. The prevalence of lower urinary tract symptoms (LUTS) in the USA, the UK and Sweden: results from the Epidemiology of LUTS (Epi-LUTS) study. BJU Int. 2009;104(3):352-60.
6. Cumitec 2C. Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections. Washington: American Society for Microbiology, 2009.
7. De Lastours V, Foxman B. Urinary tract infection in diabetes: epidemiologic considerations. Curr Infect Dis Rep. 2014;16(1):389.
8. Garcia LS, Isemberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3.ed. Washington: American Society for Microbiology, 2010.
9. Gnarpe H, Edebo L. Conditions affecting the viability of spheroplasts in urine. Infect Immun. 1970;1(3):300-4.
10. Grabe M, Bjerklund-Johansen TE, Botto H, et al. Guidelines on Urological Infections. European Association of Urology, 2013.
11. Grisaru-Soen G, Goldman R, Barzilai A, et al. False-positive urine cultures using bag collection. Clin Pediatr. 2000;39(8): 499-500.
12. Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International clinical practice guidelines from the Infectious Diseases Society of America. CID, 2010. Vol. 50, p.625-63.
13. Horsley H, Malone-Lee J, Holland D, et al. Enterococcus faecalis subverts and invades the host urothelium in patients with chronic urinary tract infection. PLoS One. 2013;8(12):e83637.
14. Irwin DE, Milsom I, Hunskaar S, et al. 2006. Population-based survey of urinary incontinence, overactive bladder, and other lower urinary tract symptoms in five countries: results of the EPIC Study. Eur Urol. 2006;50:1306-14.
15. Ito Cas. Casos Clínicos. In: Albini CA, Souza HAPHM, Silveira ACO. Infecções Urinárias - uma abordagem multidisciplinar. 1.ed. Curitiba: CRV, 2012. Cap. 46, p.705-12.
16. Karacan C, Erkek N, Senel S, et al. Evaluation of urine collection methods for the diagnosis of urinary tract infection in children. Med Princ Pract. 2010;19:188-91.
17. Kass EH. Asymptomatic infections of the urinary tract. Trans Assoc Am Physicians. 1956;69:56-64.
18. Kauffman CA, Fisher JF, Sobel JD, et al. Candida urinary tract infections – diagnosis. CID, 2011. Vol. 52, p.S452-6.
19. Khasriya R, Sathiananthamoorthy S, Ismall S, et al. Spectrum of bacterial colonization associated with urothelial cells from patients with chronic lower urinary tract symptoms. J Clin Microbiol. 2013;51(7):2054-62.
20. Kline KA, Schwatz DJ, Gilbert NM, et al. Immune modulation by group B Streptococcus influences host susceptibility to urinary tract infection by uropathogenic Escherichia coli. Infec Immun. 2012;80(12):4186-94.
21. McDermott S, Daquise V, Mann H, et al. Perinatal risk for mortality and mental retardation associated with maternal urinary-tract infections. J Fam Pract. 2001;50(5):433-7.
22. Nicolle LE. Catheter-related urinary tract infection: practical management in the elderly. Drugs Aging. 2014;31(1):1-10.
23. Oplustil CP, Zocoli CM, Tobouti NR, et al. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2010. Cap. 9, p.148-57.
24. Palmeiro JK. Infecções do trato urinário em gestantes. In: Albini CA, Souza HAPHM, Silveira ACO. Infecções Urinárias - uma abordagem multidisciplinar. 1.ed. Curitiba: CRV, 2012. Cap. 14, p.169-85.
25. Renko M, Tapanainen P, Tossavainen P, et al. Meta-analysis of the significance of asymptomatic bacteriuria in diabetes. Diabetes Care. 20011;34(1):230-35.
26. Romero R, Oyarzun E, Mazor M, et al. Mata-analysis of the relationship between asymptomatic bacteriuria and preterm delivery/low birth weight. Obstet Gynecol. 1989;73(4): 576-82.
27. Rosen DA, Pinkner JS, Jones JM, et al. Utilization of an intracellular bacterial community pathway in Klebsiella pneumoniae urinary tract infection and the effects of fimK on type 1 pilus expression. Infect Immun. 2008;76(7):3337-45.
28. Scheffer MC. Determinantes de virulência em uropatógenos. In: Albini CA, Souza HAPHM, Silveira ACO. Infecções Urinárias - uma abordagem multidisciplinar. 1.ed. Curitiba: CRV, 2012. Cap. 6, p.59-82.
29. Schmiemann G, Kniehl E, Gebhardt K, et al. The diagnosis of urinary tract infection. Dtsch Arztebl Int. 2010;107(2):361-7.
30. Szabados F, Kleine B, Anders A, et al. Staphylococcus saprophyticus ATCC 15305 is internalized into human urinary bladder carcinoma cell line 5637. FEMS Microbiol Lett. 2008;285(2):163-9.
31. Tuon FFB. Infecções do trato urinário em idosos. In: Albini CA, Souza HAPHM, Silveira ACO. Infecções Urinárias - uma abordagem multidisciplinar. 1.ed. Curitiba: CRV, 2012. Cap. 16, p.207-19.
32. Baron EL, Miller M, Weinstein MP, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). Clinical Infectious Diseases 2013; 57 (4): e22-e121.

33

capítulo

Vlademir V. Cantarelli

Coprocultura

INTRODUÇÃO

Gastroenterites agudas ainda representam importante causa de mortes de crianças menores de um ano de idade. Em países desenvolvidos, as mortes por gastroenterites são relativamente raras, porém, em geral, anualmente são estimados de 1,5 a 2 milhões de mortes de crianças com menos de cinco anos de idade, sobretudo nos países em desenvolvimento. A incidência e a mortalidade causadas por gastroenterites são maiores em crianças menores de um ano de idade. No Brasil, houve uma redução da mortalidade infantil por diarreia, de 11,9 para 0,2 por mil nascidos vivos em 1980 e 2000, respectivamente. Diferenças regionais que refletem na facilidade de acesso aos serviços de atenção à saúde, saneamento básico, desnutrição, qualidade da água, entre outros, proporcionam ainda um cenário ideal para a ocorrência de diarreia infantil, especialmente em crianças de baixo nível socioeconômico.

O consumo de água e de alimentos contaminados sempre foram elementos essenciais para a transmissão de enteropatógenos. De fato, grande parte da população mundial foi afetada por pelo menos sete pandemias causadas pelo *Vibrio cholerae* nos últimos duzentos anos. Em 1991 um novo surto de cólera se iniciou no Peru, e em 1992 havia atingido quase a totalidade dos países latinos, incluindo o Brasil.

Salmonella, Shigella e *Campylobacter* são causas comuns de diarreia infecciosa e são comumente isolados por cultivo das fezes em meios específicos. Historicamente, também, algumas cepas específicas de *Escherichia coli* são relacionadas a surtos de diarreia. Em 1945, John Bray comprovou que cepas específicas de *Escherichia coli* eram responsáveis por surtos de diarreia infantil na Inglaterra. Essas cepas foram chamadas EPEC (*E. coli* enteropatogênica), e, embora amplamente estudadas, ainda hoje não se conhece o exato mecanismo de produção de diarreia por esses enteropatógenos. Nos anos de 1970 foram descritas duas novas categorias de *E. coli* causadoras de diarreia: *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), cujo mecanismo de produção de diarreia está relacionado à produção das toxinas termolábil (LT) ou termoestável (ST), e *E. coli* enteroinvasora (EIEC), com um mecanismo de patogenia indistinguível de *Shigella* spp. O interesse pelas EPECs ressurgiu nos anos 1980, quando ensaios utilizando linhagens de células epiteliais em cultivo demonstraram haver pelo menos três categorias de *E. coli* capazes de aderir a essas células formando padrões de aderência distintos. Um padrão de aderência localizada, formando microcolônias sobre as células epiteliais é típico de EPEC; as cepas que aderem de forma difusa sobre toda a superfície celular foram denominadas DAEC; enquanto um terceiro tipo, que demonstrou um padrão de aderência em fileiras, imitando tijolos na parede, denominado *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Figura 33.1).

A década de 1980 também ficou marcada pelo surgimento de uma nova categoria *E. coli* enteropatogênica capaz de causar diarreia seguida do aparecimento de sangue nas fezes (colite hemorrágica) e, eventualmente, evoluindo para a síndrome urêmico hemorrágica (SUH). Os primeiros surtos, reportados em 1983, foram relacionados ao consumo de carne bovina (hambúrgueres) contaminada por um sorotipo até então raro de *E. coli* (O157:H7). No mesmo ano provou-se a associação entre SUH e a presença de uma citotoxina nas fezes dos pacientes, conhecida como Shiga toxina (Stx). Essas cepas foram chamadas de *E. coli* êntero-hemorrágicas (EHEC) ou produtoras de Shiga toxina (STEC). Embora o sorotipo O157:H7 tenha sido implicado em numerosos sur-

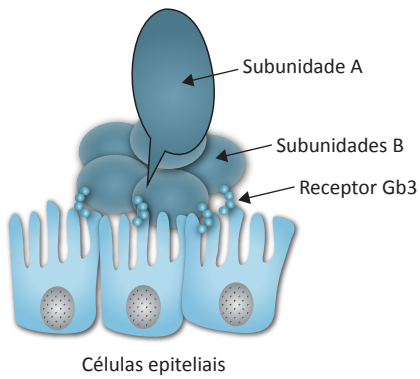


Figura 33.1 Representação esquemática da Stx produzida por EHECs.

Fonte: Acervo do autor.

tos de gastroenterites, por exemplo, mais de 10 mil pessoas contaminadas em 1996 em um surto em Sakai, nos arredores de Osaka, Japão, atualmente inúmeros outros sorotipos de *E. coli* são relacionados à produção de Stx, e com o mesmo potencial para causar colite hemorrágica e SUH. Para ilustrar este fato, em 2011 ocorreu um surto de SUH na Alemanha, causado por uma EHEC sorotipo O104:H4, que resultou em 3.842 casos reportados de infecções humanas.

Além das espécies citadas, outras espécies de bactérias são também responsáveis por causar surtos de doenças gastrointestinais, como *Aeromonas, Plesiomonas* e *Yersinia enterocolitica*. Algumas espécies, como *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* e *Clostridium perfringe,* são capazes de produzir toxinas que causam vômitos e diarreia associados ao consumo de alimentos contaminados por esses patógenos. Nesses casos, o isolamento da bactéria em grandes quantidades no alimento contaminado e a determinação da capacidade de produção de enterotoxinas por esses isolados são necessários para implicar tais patógenos como causadores dos sintomas.

Clostridium difficile é a principal causa de diarreia nosocomial, colite pseudomembranosa, megacólon e, eventualmente, colite fulminante. A maioria dos casos ocorre em adultos (especialmente > 65 anos ou imunocomprometidos), após a exposição a antibióticos de amplo espectro, porém deve ser considerada a hipótese de infecção *C. difficile* em todo paciente com contagem de leucócitos > 30.000 (excluindo pacientes com leucemia), mesmo com fezes normais. O impacto financeiro dessas infecções é substancialmente alto, estimado em 5 a 15.000 Euro/caso na Inglaterra, e 1,1 bilhão de dólares/ano nos Estados Unidos. *C. difficile* produz duas toxinas, TcdA e TcdB, capazes de inativar GTPases celulares, produzindo importantes alterações no citoesqueleto das células epiteliais. Por muitos anos a detecção dessas toxinas nas fezes do paciente através de métodos imunológicos foi considerado o principal método de diagnóstico dessas infecções. Porém, atualmente, esses métodos são considerados de baixa sensibilidade e estão sendo substituídos por métodos moleculares.

É importante lembrar que, embora muitas bactérias estejam associadas a gastroenterites, parasitas, como *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum,* entre outros, também são causas conhecidas de diarreia, assim como alguns vírus. De fato, a grande maioria dos quadros de doença gastrointestinal, especialmente em crianças, é causada por rotavírus e norovírus, portanto, resultados de coproculturas negativas não excluem a possibilidade de diarreia infecciosa por outros agentes.

PATÓGENOS E MECANISMOS DE PATOGENIA

- ***Aeromonas* spp.:** *A. hydrophila* e *A. caviae* parecem ser as espécies mais isoladas de casos de diarreia. Pouco se sabe sobre os fatores de virulência relacionados à patogenia gastrointestinal. Estudos *in vitro* sugerem que apenas uma pequena fração dos isolados possui capacidade de invadir células em cultivo. Genes codificando enterotoxinas foram identificados em alguns isolados, mas o papel individual dessas toxinas na produção de diarreia ainda não está claro.
- ***Campylobacter* spp**: *C. jejuni* e *C. coli* são as espécies mais comumente encontradas em casos de diarreia humana associados ao consumo de alimentos contaminados. A toxina distensora citoletal (CdtA, B e C) parece ser um importante fator de patogenicidade em *c. jejuni*, e induz apoptose das células infectadas. Entretanto, não se conhece ainda os fatores específicos relacionados com a capacidade desses organismos causarem diarreia.
- ***Clostridium difficile:*** Cepas toxigênicas produzem até três toxinas: citotoxinas TcdA, TcdB, e toxina binária CDT (*C. difficile* transferase). Todas as cepas que causam diarreia produzem TcdB, sendo que a maioria também produz TcdA. TcdA e TcdB possuem a capacidade de glicosilar e inativar GTPases (Rac, Rho e Cdc42) nas células hospedeiras, causando profundas alterações no citoesqueleto celular, rompendo a barreira intracelular e induzindo apoptose. Ambas as toxinas são também capazes de produzir inflamação, contribuindo para o dano celular e tecidual. A produção da toxina binária CDT está associada a maior mortalidade dos pacientes, porém não está claro se a toxina é um marcador de cepas mais virulentas, ou se a toxina contribui diretamente para o aumento da patogenia dessas cepas.
- ***Escherichia coli* produtoras de diarreia**: Mecanismos de virulência distintos estão associados com os diferentes tipos de *E. coli* relacionados à diarreia:
  - **EPEC**: *E. coli* pertencentes a esse grupo de enteropatógenos possuem a habilidade de aderir às células intestinais por meio de microfilamentos chamados BFP (*Bundle-Forming Pilus*). Após essa aderência inicial, o contato com a célula hospedeira ativa um complexo sistema de secreção (sistema de secreção do tipo III), por onde são injetados fatores de virulência bacterianos diretamente no citoplasma da célula hospedeira. Um desses fatores é denominado Tir (Translocated Intimin Receptor), que, após ter um resíduo específico de tirosina fosforilado por quinases da célula hospedeira, se insere na membrana celular e forma um receptor para a bactéria, que se adere intimamente a este receptor através de uma proteína de membrana chamada intimina. Durante esse processo ocorre o desaparecimento das microvilosidades celulares ao redor da bactéria e há profundas mudanças no citoesqueleto celular, resultando no aparecimento de uma estrutura rica em filamentos de actina, em forma de pedestal, que eleva a bactéria acima da superfície da célula hospedeira. Todos os genes necessários envolvidos na transdução de sinal e rearranjo do citoesqueleto da célula hospedeira estão codificados em uma região contendo 35 kb no cromossomo bacteriano denominada LEE (Locus of Enterocyte Effacement), e que não está presente em outras cepas de *E. coli* pertencentes à

microbiota intestinal normal ou mesmo de cepas não envolvidas em casos de diarreia. A diarreia pode ser o resultado de múltiplos mecanismos, incluindo secreção ativa de íons cloreto e perda da capacidade absortiva das células intestinais devido à perda massiva das microvilosidades celulares.

- **EHEC**: O principal fator de virulência estudado em EHECs é a Shiga toxina - Stx - (também chamada verotloxina por sua capacidade de destruir células Vero em cultivo). Stx é codificada por um bacteriófago integrado ao cromossoma bacteriano. Existem duas variantes de Stx (Stx1 e Stx2), que não produzem imunização cruzada, e são compostas de uma subunidade A e cinco subunidades B, responsáveis pelo reconhecimento e pela ligação da toxina a um receptor presente na superfície da célula hospedeira (receptor glicolipídico Gb3 ou Gb4, ver Figura 33.1). Após a ligação ao receptor, a subunidade A é translocada para dentro da célula, onde age sobre a unidade 60S ribossomal. A remoção de uma única adenina da subunidade 28S ribossomal pela ação N-glicosidase da toxina A resulta em inibição da síntese proteica e morte celular. EHECs podem produzir e secretar uma ou ambas as toxinas, que podem ser translocadas e transportadas a locais distantes pela corrente sanguínea. Qualquer célula que possua o receptor Gb3 (ou Gb4), incluindo células intestinais e endoteliais renais, pode ser afetada pelas toxinas Stx1 e/ou Stx2. Esses eventos estão diretamente associados à colite hemorrágica e à eventual evolução para síndrome urêmico-hemorrágica (SUH) observadas em pacientes infectados por EHECs. Vários sorotipos de EHEC, incluindo O157:H7, expressam fatores de aderência virtualmente idênticos aos encontrados em EPECs, enquanto em outros sorotipos, como por exemplo o recente sorotipo O104:H4 envolvido em surto na Alemanha, podem aderir às células epiteliais por outros mecanismos.
- **EAEC**: *E. coli* pertencentes a essa categoria possuem em comum a capacidade de aderir às células intestinais ou epiteliais produzindo um padrão de aderência característico, tipicamente descrito como semelhante a tijolos enfileirados em uma parede (Figura 33.2). Embora diversas toxinas, adesinas e outras proteínas associadas à virulência tenham sido identificadas nessas cepas, nenhum desses fatores foi encontrado em todas as cepas de EAEC. A formação de biofilme também tem sido associada à patogenia desses microrganismos. Entretanto, as EAEC ganharam nova importância ao se verificar que o isolado de *E. coli* sorotipo O104:H4 produtora de Stx2, e responsável pela maior frequência de casos de SUH e morte, jamais reportado em outro surto causado por uma cepa entero-hemorrágica, possuía aderência do tipo enteroagregativa. Até então, as EHECs clássicas possuíam os mesmos mecanismos e genes para a aderência localizada observada em EPECs. Interessantemente, embora recuperada de um caso único de diarreia infantil, o único isolado de EHEC reportado em Porto Alegre, RS, pertencente ao sorotipo O91:H21, era do tipo agregativo e também produtora de Stx2. EAECs estão se tornando importantes causas de diarreia associadas ao consumo de alimentos contaminados e o fato de algumas cepas adquirirem a capacidade de produzir Shiga toxina deve aumentar o interesse por esses patógenos.
- **EIEC**: *E. coli* enteroinvasoras possuem genes plasmidiais e cromossômicos, que conferem a estes isolados a capacidade de invadir as células que recobrem a mucosa do cólon, produzindo intensa inflamação local. Os genes associados e o mecanismo de pa-

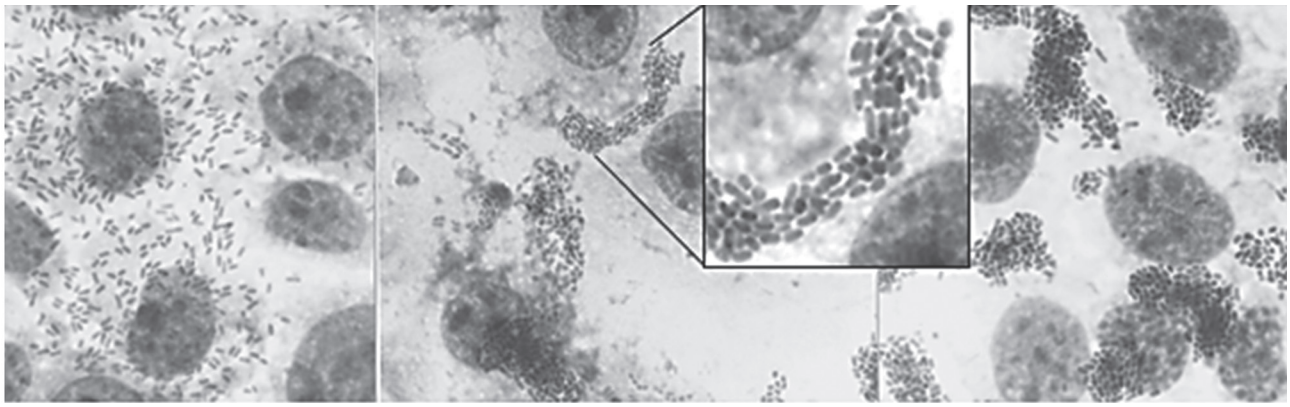


Figura 33.2 Aderência típica de algumas cepas enteropatogênicas de *E. coli* em células Hep-2.
Fonte: Acervo do autor.

togenia de EIEC é idêntico aos encontrados em *Shigella* spp., e são discutidos a seguir.

- **ETEC:** Conhecidas desde a década de 1970, ETECs são uma importante causa de diarreia infantil e em viajantes que retornam de regiões não industrializadas do globo. Após a colonização da mucosa do intestino delgado, ocorre diarreia secretória como resultado da ação das toxinas termolábil (LT) ou termoestável (ST). ETECs podem produzir apenas uma ou ambas as toxinas. LT é uma toxina do tipo oligomérica, composta de uma subunidade A e cinco subunidades B. As subunidades B são responsáveis pela ligação da toxina ao receptor celular – gangliosídio GM1. A atividade tóxica é exercida pela subunidade A que, uma vez translocada para o interior da célula hospedeira, atuará sobre seu alvo: a enzima adenilato ciclase localizada na membrana basolateral das células epiteliais. A atividade de ADP-ribosiltransferase da toxina A age através da transferência de uma molécula de ADP-ribosil do NAD para a subunidade α da proteína ligadora de GTP (Gs), que por sua vez resulta na estimulação irreversível da adenilato ciclase, levando ao aumento dos níveis intracelulares de AMP (AMPc). O resultado final é a ativação de uma proteína quinase e fosforilação aumentada dos canais de cloreto, sobretudo o CFTR, e estimulação da secreção de íons cloreto e inibição da absorção de NaCl pelas células da mucosa intestinal, resultando em diarreia osmótica. A toxina LT é estrutural e funcionalmente muito semelhante à toxina do cólera (CT). Existem duas variantes sorológicas de LT (LT-I e LT-II), cada uma delas com algumas variantes antigênicas (LTp-I, LTh-I, LT-IIa e LT-IIb), porém com mecanismo de ação muito similar. Diferente da LT, a toxina termoestável madura (ST) é formada por um pequeno peptídio (18-19 aa STa e 45 aa STb). Existem duas classes diferentes de STs, que diferem em estrutura e mecanismo de ação (STa e STb). STa age estimulando o aumento intracelular de GMP (GMPc), resultando em secreção de íons cloreto, de maneira muito similar à ação da LT. Ao contrário, STb age estimulando a secreção de bicarbonato pelas células intestinais, sem estimular o aumento de AMPc ou GMPc.
- ***Shigella, Salmonella* e *Yersinia* spp.:** Esses três gêneros de enteropatógenos apresentam em comum um sofisticado mecanismo de secreção, utilizado para injetar fatores de virulência bacterianos diretamente dentro do citoplasma da célula hospedeira. O SST3 é uma nanoseringa molecular, formado por proteínas conservadas entre as diferentes espécies, que somente é ativado através do contato da bactéria com a célula hospedeira.
  Shigella spp. é basicamente o resultado da sua capacidade de invasão celular e consequente inflamação da mucosa intestinal. O processo de invasão é complexo e está relacionado à injeção de invasinas (IpaA-D) através do SST3 bacteriano, que provocam uma reorganização dramática do citoesqueleto celular e resulta na entrada da bactéria na célula hospedeira. Inicialmente, a bactéria deve invadir as células M, encontradas nas placas de Payer intestinais, para ter acesso aos receptores TLR4 presentes na membrana basolateral das células da mucosa. A ativação do TLR4 induz a liberação de interleucina 6 e 8 (IL-6, IL-8), que por sua vez são responsáveis pela atração de leucócitos PMN e produção de inflamação e necrose celular (Figura 33.3). A bactéria possui também a habilidade de se mover dentro das células epiteliais pela formação de uma cauda de actina numa das extremidades da bactéria, resultado da ação coordenada das proteínas IscA, IpaA e, provavelmente, vários outros efetores secretados pelo SST3.
- *Salmonella, Typhimurium* e *S. enteritidis* podem infectar uma grande variedade de animais e causar desde infecções sistêmicas fatais até o estabelecimento de um estado de carreadores assintomáticos. Em humanos, a infecção por

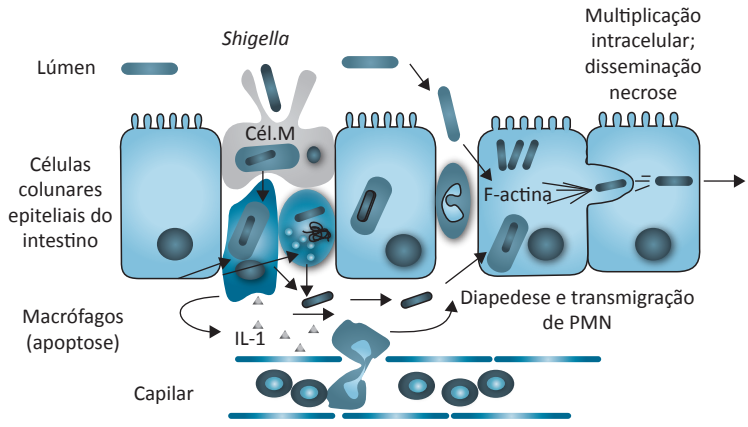


Figura 33.3 Interação de *Shigella* com células epiteliais intestinais.
Fonte: Acervo do autor.

esses sorotipos se manifesta por enterocolites raramente seguidas de infecções sistêmicas. Uma vez ingerida com alimentos ou água contaminada, a bactéria adere e invade as células epiteliais intestinais. Esse mecanismo está relacionado à indução da fagocitose de bactérias por células não fagocíticas, processo que necessita da injeção de fatores de virulência bacterianos no interior da célula hospedeira através do SST3. Ao contrário das infecções por *Shigella,* não há indução de um processo inflamatório intenso pela *Salmonella,* que se multiplica no interior dessas células. A capacidade de invadir e se multiplicar dentro das células hospedeiras é essencial para a sobrevivência da bactéria e estabelecimento da infecção (Figura 33.4).

Y. enterocolitica utiliza o SST3 para secretar ao menos seis proteínas chamadas coletivamente Yop. *Y. enterocolitica* inicialmente se adere e penetra o epitélio intestinal através de uma indução forçada da fagocitose, mediada por invasina, uma proteína de membrana bacteriana, que se liga à B1-integrina presente na superfície da célula hospedeira. Os efetores YopE YopT e YopO interferem com o rearranjo do citoesqueleto celular pela interação com Rho GTPases. *Y. enterocolitica* também é capaz de se disseminar através do sistema linfático, onde se proliferam extracelularmente. Enquanto a maioria das outras bactérias seria fagocitada e destruída, *Y. enterocolitica* é capaz de se ligar à superfície dos macrófagos e inibir a sua função fagocítica através da ação da proteína YopH. *Y. enterocolitica* é um patógeno capaz de causar não somente doença gastrointestinal, mas pode também evoluir para sepse, com alta mortalidade. Além disso, *Y. enterocolitica* possui a capacidade de se multiplicar a temperaturas baixas (4 °C ou menos). O número de infecções intestinais causadas por esse patógeno é provavelmente subestimado (Figura 33.5).

- ***Vibrios*:** São bacilos Gram-negativos em forma de vírgula. *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* são duas espécies frequentemente associadas a surtos de gastroenterites e possuidoras de SST3. Outras espécies de víbrios podem ocasionalmente ser isoladas de infecções extraintestinais, como feridas e casos de sepses.

O principal mecanismo de patogenia encontrado em *V. cholerae* é a secreção de uma potente toxina composta

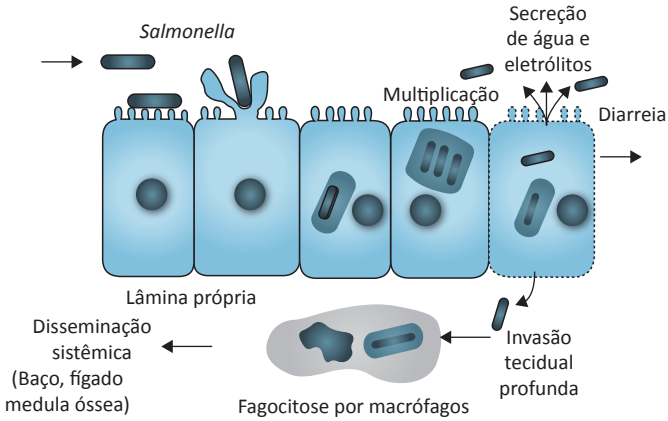


Figura 33.4 Interação de *Salmonella* com células epiteliais intestinais.
Fonte: Acervo do autor.

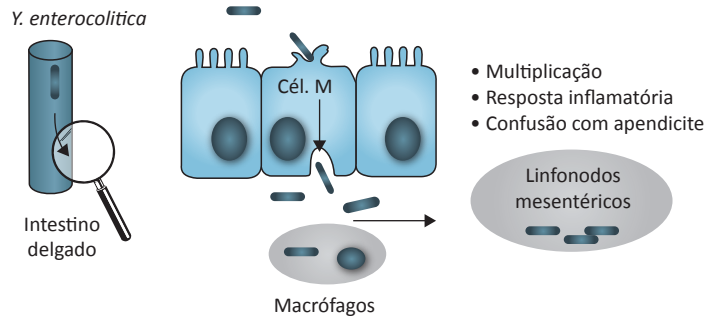


Figura 33.5 Interação de *Y. enterocolitica* com as células epiteliais intestinais.
Fonte: Acervo do autor.

de uma subunidade A e cinco subunidades B, chamada CT, muito semelhante a LT produzida por ETECs (Ver acima). Existem mais de 140 sorogrupos de *V. cholerae,* entretanto apenas o sorogrupo O1 e O139 causam a vasta maioria das infecções humanas.

V. parahaemolyticus foi isolado pela primeira vez em Osaka, Japão, em 1950, após um surto de gastroenterite aguda provocado pelo consumo de *shirasu,* uma espécie de sardinha seca. O consumo de frutos do mar contaminados com o organismo é a principal fonte de infecção. *V. parahaemolyticus* pode ser encontrado em ambientes marinhos em todo o mundo, e com o aquecimento dos oceanos foi isolado, inclusive, no sul do Alaska. Praticamente todos os isolados humanos de *V. parahaemolyticus* produzem duas toxinas: TDH (*Thermostable Direct Hemolysin*) e TRH (*TRH-related hemolysin*) capazes de hemolisar hemácias. A patogenicidade desse microrganismo também está relacionada a uma grande quantidade de efetores (Vot) secretados através do SST3, muitas dessas proteínas com atividade citotóxica.

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

Fezes é a amostra adequada para a coprocultura, mas um *swab* retal, contendo material fecal visível, também pode ser utilizado. Preferivelmente, coletar a amostra durante os primeiros quatro dias do início da diarreia. O tempo de transporte para o laboratório é crítico, principalmente para *Shigella* spp., e a amostra deve ser processada em, no máximo, 1 a 2 horas após a coleta. Para tempos superiores é importante usar um *swab* e meio de transporte mantido a 4 °C, inclusive durante o transporte. Normalmente os meios de Cary-Blair, Stuart e Amies são adequados para todos os enteropatógenos. Salina com glicerina tamponada pode ser utilizada para *E. coli, Salmonella* e *Shigella,* porém não deve ser usada para o isolamento de *Campylobacter* e *Vibrio.* Por ser inviável o isolamento e a identificação de todos os enteropatógenos, a maioria dos laboratórios opta por uma rotina para o cultivo dos principais agentes (*Salmonella, Shigella*). Os outros enteropatógenos podem ser considerados devido à epidemiologia local (cólera, por exemplo) ou quando houver solicitação médica especificando o enteropatógeno a ser pesquisado.

E. coli produtoras de diarreia

E. coli pode ser isolada facilmente em meios de culturas seletivos comumente utilizados para bacilos Gram-negativos, como: McConkey Agar e EMB. A grande dificuldade é distinguir as cepas enteropatogênicas dos isolados não patogênicos, uma vez que esse gênero de microrganismos é parte da microbiota normal do trato gastrointestinal. Historicamente, a aglutinação com antissoros específicos foi utilizada para a caracterização inicial dos isolados com potencial patogênico (EPECs), principalmente em casos de surtos de diarreia infantil, pois o número de sorotipos associados à produção de diarreia é limitado. Entretanto, no laboratório clínico a identificação sorológica apenas não permite identificar com segurança esses patógenos, especialmente EPECs, pois a sorologia completa, com antissoros anti-O (somáticos), e anti-H (flagelares), não é realizada rotineiramente nesses laboratórios, que normalmente usam apenas antissoros somáticos polivalentes para a triagem inicial de EPEC. Não é correto afirmar que um isolado de *E. coli* que produziu aglutinação com um determinado antissoro anti-O, por exemplo, anti-O111, seja EPEC, pois apenas alguns sorotipos específicos de *E. coli* O111 (por exemplo: O111:H2, O111:H12, O111:H21) são associados com EPEC. Além disso, o mesmo sorogrupo/sorotipo pode estar associado com outros mecanismos de enteropatogenicidade. Por exemplo: *E. coli* O111:NM, O111:H2 e O111:H8 são associados com *E. coli* entero-hemorrágicas, enquanto *E. coli* O111ab:H21 é tipicamente encontrado representando cepas enteroagregativas. Outros sorotipos de *E. coli* O111, não pertencentes aos acima descritos, podem ser encontrados em isolados da microbiota normal. Embora um conjunto de sorotipos seja relacionado a cepas capazes de produzir diarreia, a enteropatogenicidade depende da presença de genes plasmidiais e cromossômicos específicos (*eae, tir, bfp,* etc.), não presentes em isolados não enteropatogênicos de *E. coli*. Quando necessária, a identificação definitiva de EPEC pode ser realizada em laboratórios de referência por: 1) testes para demonstrar a aderência localizada em cultivos celulares; 2) observação do acúmulo de filamentos de actina diretamente sob o local de aderência de EPEC em células epiteliais em cultivo, também chamado *FAS assay* (*Fluorescence Actin Staining*); ou 3) métodos moleculares, como a PCR, para a detecção dos genes de virulência associados a EPECs.

O isolamento de EHEC O157:H7 é possível somente na fase inicial da infecção, e normalmente não é mais isolada após cinco a sete dias do início da infecção. EHEC O157:H7, tipicamente, não fermenta ou fermenta muito lentamente o sorbitol. McConkey sorbitol, com sorbitol, em substituição à lactose, pode ser utilizado para a triagem inicial de O157:H7, que formam colônias transparentes nesse meio (sorbitol negativo). Outras cepas de *E. coli* normalmente fermentam sorbitol e formam colônias avermelhadas, devido à produção de ácido a partir desse açúcar e de mudança no indicador de pH do meio. Vários meios cromogênicos foram desenvolvidos para o reconhecimento rápido desse sorotipo de EHEC. Em qualquer meio, as colônias suspeitas devem ser testadas com antissoro anti-O157. *E. coli* pertencentes a esse sorogrupo são invariavelmente produtoras de Shiga toxina. Não há meios específicos para a triagem de outros sorotipos de EHEC (por exemplo, O26:H11, O91:H21, O104:H4, O111:H2 etc.) e a presença destes organismos pode ser comprovada indiretamente pela detenção direta de Shiga toxina nas fezes, usando testes imunológicos comerciais. Alternativamente pode-se detectar a presença dos genes Stx1 e Stx2 nos isolados suspeitos através de método molecular.

EIECs possuem características semelhantes à *Shigella*. São bioquimicamente inativas, imóveis, e lisina negativas. A identificação definitiva requer o uso de testes moleculares para a detecção de fatores de virulência, como: *ipaC* ou *ipaH,* compartilhados também com *Shigella*.

Não há meio de cultivo seletivo para STECs, EAECs e outras *E. coli* enteropatogênicas. As toxinas ST e/ou LT (STEC) podem ser caracterizadas por ensaios biológicos, imunológicos (no sobrenadante de culturas) ou por amplificação de ácidos nucleicos. Estes últimos representam provavelmente a melhor alternativa para a confirmação dessas cepas.

Salmonella, Shigella e *Yersinia*

Embora esses microrganismos possam ser isolados em Ágar McConkey, o uso de meios seletivos permite selecionar as colônias suspeitas de maneira mais eficiente. Não há um meio de cultivo ideal para o isolamento de todas essas espécies, e o uso de meios de enriquecimento é controverso. Normalmente, em casos de diarreia aguda, a quantidade do patógeno nas fezes é grande o suficiente para permitir seu reconhecimento em meios seletivos. Meios de enriquecimento podem ser úteis para identificar portadores, especialmente de *Salmonella*. Caldo selenito é utilizado para o enriquecimento de *Salmonella* e *Shigella,* porém neste último caso não está comprovada a utilidade deste meio. Em qualquer caso, após o enriquecimento, o caldo deve ser subcultivado em meio de cultivo seletivo para a triagem das colônias suspeitas.

Dentre os meios utilizados, destaca-se o meio de SS, XLD e Hektoen (HE), entre outros. As colônias suspeitas de *Salmonella* normalmente são incolores (lactose negativas), com centro preto (produção de H_2S). Uma maneira prática para a triagem das colônias é inocular a colônia suspeita em ágar lisina e ferro (LIA). *Salmonellas* utilizam a lisina e produzem H_2S ao longo da linha de inoculação. Algumas espécies de *Citrobacter* também podem produzir H_2S no LIA, porém são rapidamente reconhecidos por não descarboxilarem a lisina. A separação entre *Salmonella* e *Citrobacter* também pode ser realizada rapidamente pelo teste de PYR, sendo negativo no primeiro caso e positivo no segundo. Um teste de aglutinação em lâmina utilizando antissoro anti-O (polivalente) deve ser utilizado para comprovar a identificação fenotípica. A classificação taxonômica de *Salmonella* tem sofrido modificações nos últimos tempos. Existe grande número de sorogrupos e sorotipos de *Salmonella*. A discussão deste assunto não será apresentada aqui, podendo ser encontrada em revisões recentes da literatura.

Shigella produz colônias incolores (lactose negativa), enquanto a maioria das outras enterobactérias produz colônias de rosa-avermelhadas, devido à fermentação da lactose (SS ágar) ou amarelas pelo uso da xilose (XLD). As espécies de *Shigella* são bioquimicamente inativas, imóveis, indol e lisina negativas. Pela sua semelhança bioquímica com alguns isolados de *E. coli* inativas, a utilização de testes de aglutinação com antissoros específicos é fundamental para a identificação definitiva desses microrganismos. Historicamente, cada um dos quatro grupos de *Shigella* é considerado uma espécie diferente. Assim, o sorogrupo A corresponde a *S. dysenteriae;* B a *S. flexneri;* C a *S. boydii;* e D a *S. sonnei*. Entretanto, do ponto de vista genético, todos os sorogrupos representam uma só espécie e seriam classificados atualmente como biovariedades de *E. coli*. Para evitar confusão, sobretudo na literatura médica, a classificação clássica de *Shigella* é mantida nos dias de hoje.

Yersinia enterocolitica cresce em meios como ágar McConkey, SS e XLD, produzindo colônias pequenas nas primeiras 24 horas de incubação, aumentando significativamente após 48 horas de incubação. Devido ao fato de fermentarem sacarose e crescerem mais lentamente que as outras enterobactérias, é recomendado o uso de meios seletivos, como o ágar cefsulodina, irgasan e novobiocina (CIN). Neste meio, a maioria das outras enterobactérias são inibidas (com exceção de Serratia, Morganella e Citrobacter), enquanto *Yersinia enterocolitica* produz colônias características, com um centro avermelhado (*Bull´s eye*). A identificação inicial pode ser realizada pelas reações típicas em TSI (A/A), motilidade positiva a 25 °C, PYR positivo, lisina negativa (LIA) e urease positiva. O uso de sorologia com antissoro anti-O polivalente permite confirmar a identificação deste microrganismo.

Víbrios são organismos fermentadores e não fastidiosos, semelhantes às enterobactérias, que crescem em meios de cultivos tradicionalmente utilizados em bacteriologia clínica. As amostras de fezes diarreicas devem ser enviadas ao laboratório rapidamente, onde são inoculadas em ágar sangue de carneiro e McConkey por 24 horas em aerobiose. Víbrios produzem colônias hemolíticas e são oxidase-positivos, características úteis para a triagem inicial das colônias em ágar sangue de carneiro. Em áreas endêmicas, pode ser utilizado o meio de TCBS (*Tiosulfato, Citrato, Bile e Sacarose*). Nesse meio, *V. cholerae* e *V. alginolyticus* formam colônias amarelas após 24 horas de incubação devido à fermentação da sacarose. *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, que não fermentam a sacarose, formam colônias azul-esverdeadas. Amostras fecais de pacientes convalescentes podem apresentar baixa quantidade de víbrios. Neste caso, a inoculação da amostra em água peptonada alcalina (1% peptona, 1% NaCl, pH 8,6) por 12 a 18 horas, seguido de subcultivo em ágar TCBS, pode aumentar as chances de isolamento dos víbrios. A identificação definitiva deve ser realizada através de sorologia (*V. cholerae*) e testes bioquímicos diversos (outros víbrios).

Aeromonas pode ser facilmente isolada de fezes nos meios de culturas tradicionais, como o ágar sangue de carneiro (ASC) e o McConkey. *Aeromonas* produzem hemólise ao redor das colônias em ASC. O teste da oxidase é útil para distinguir entre as colônias de *Aeromonas* (positiva) e enterobactérias (negativa). *Pseudomonas aeruginosa* também é oxidase- positiva, mas não fermenta glicose. Para aumentar a seletividade, pode-se utilizar o ASC adicionado de ampicilina (10 mg/L). O meio de CIN, originalmente descrito para o isolamento de *Yersinia enterocolitica*, também suporta o crescimento de *Aeromonas.* Nos casos de necessidade de meios de enriquecimento, pode-se utilizar água peptonada alcalina. A identificação definitiva das espécies de *Aeromonas* é obtida através de séries bioquímicas tradicionais ou em equipamentos de identificação bacteriana automatizados.

P. shigelloides é um bacilo Gram-negativo, móvel e fermentador de diversos açúcares. Cresce em ASC e McConkey, onde forma colônias lactose-negativas, que podem ser confundidas com *Shigella* spp. São oxidase- positivas, porém, diferentemente de *Aeromonas*, não produzem colônias com

zona de hemólise em ASC. O meio de ASC com ampicilina não é adequado para o isolamento de *P. shigelloides*. A confirmação da identificação é obtida por uma bateria de testes bioquímicos manuais ou automatizados.

Campylobacter jejuni e *C. coli* não crescem nos meios tradicionalmente usados em bacteriologia, como o ASC e o McConkey. O isolamento dessas espécies depende de três fatores: 1) meios de cultivos especiais; 2) atmosfera adequada; e 3) temperatura de incubação adequada. *C. jejuni* e *C. coli* crescem a 35 °C e toleram temperaturas de 42 °C. Bactérias da flora normal em geral não toleram temperaturas elevadas e a incubação das culturas a 42 °C aumenta a seletividade do meio de cultivo, porém exige a incubação em estufas dedicadas ao isolamento de *Campylobacter.*

Diversos meios de cultivo foram idealizados para o isolamento de *Campylobacter*. Os mais conhecidos são os de Butzler e o Skirrow, a base de sangue e adição de antibióticos, e o *charcoal-based selective médium* (CSM), um meio sem sangue, à base de carvão ativado e suplementado com hematina e piruvato de sódio mais antibióticos. É possível a utilização de membranas filtrantes para auxiliar o isolamento de *Campylobacter* spp. de amostras clínicas (fezes) ou ambientais (água, esgoto etc.). A técnica consiste em colocar uma membrana filtrante de nitrocelulose sobre a superfície da placa do meio de cultivo apropriado e espalhar sobre a superfície da membrana filtrante uma suspensão de fezes (em solução fisiológica). Após incubação por uma hora, a 37 °C, a membrana é retirada e a placa é colocada em uma jarra com a atmosfera adequada (ver a seguir), adequada e reincubada por 24 a 48 horas na mesma temperatura. A membrana deve ter poros de 0,45 μm (alternativamente 0,6 μm). *Campylobacter* spp. passa através desses poros e chega à superfície do meio de cultivo, enquanto outros microrganismos presentes na amostra ficam retidos na superfície do filtro.

A atmosfera ideal para o isolamento de *C. jejuni* e *C. coli* contém 5% de oxigênio, 10% de CO_2 e 85% de nitrogênio. O uso da jarra com vela acesa não é recomendado, pois o nível de oxigênio residual é da ordem de 12% a 17%, considerado alto para o crescimento desses microrganismos. Existem disponíveis comercialmente sistemas capazes de gerar a atmosfera ideal para a incubação de culturas de *Campylobacter,* baseados na geração e no consumo de gases atmosféricos através de reações químicas, sendo normalmente ativados pela adição de água e colocados no interior de um recipiente hermeticamente fechado, onde são colocadas as placas com os meios de cultivo inoculados com fezes. As culturas devem ser incubadas por 48 horas, a 42 °C, antes de serem abertas para a inspeção.

O aparecimento de colônias cinza, planas, irregulares e com tendência a crescer de forma confluente é um indicativo do crescimento de *Campylobacter.* Oxidase e catalase são positivas para esses microrganismos e uma coloração de Gram pode distinguir entre *Campylobacter* – bacilos Gram-negativos curvos, espiralados, ou em forma de "S" – de outros bacilos Gram-negativos, oxidase-negativa como *Pseudomonas. C. jejuni* hidrolisa o hipurato enquanto a espécie *C. coli* não utiliza esse substrato. A separação dessas duas espécies pela sensibilidade ao ácido nalidixico não é mais indicada devido ao aumento da prevalência de cepas resistentes às fluoroquinolonas.

C. difficile pode ser isolado das fezes de indivíduos assintomáticos, portanto o cultivo não é considerado um método adequado para o diagnóstico das infecções gastrointestinais por esse microrganismo e não será abordada neste capítulo. Entretanto, a cultura pode ser útil para estudos de tipagem molecular e determinação do perfil de suscetibilidade do microrganismo. As toxinas TcdA e TcdB podem ser detectadas diretamente nas fezes por métodos imunológicos, porém a sensibilidade e especificidade dos imunoensaios é considerada baixa (45% a 95% e 75% a 100%, respectivamente). Por este motivo, o teste deve ser repetido se for negativo para um paciente com forte suspeita clínica de infecção por *C. difficile*. Idealmente, o método deve ser capaz de detectar ambas as toxinas, embora se saiba que a sensibilidade para a detecção da TcdB é inferior à da TcdA. Isso pode representar um problema, pois algumas cepas epidêmicas produzem apenas TcdB, sendo igualmente patogênicas. Recentemente, se tem observado aumento no interesse por métodos moleculares (PCR) para a detecção dos genes *tcdA/tcdB.* Um resultado negativo nesses testes normalmente descarta a possibilidade de infecção por *C. difficile,* entretanto, um resultado positivo deve ser avaliado com cautela, visto que existem, também, portadores sadios dessas cepas. Devido à possibilidade de resultados falso-negativos por problemas inerentes aos métodos moleculares (inibição), todos os testes devem também ser capazes de detectar algum gene comum (*housekeeping gene*) a todas as cepas de *C. difficile*. Um resultado positivo para o gene comum e negativo para genes das toxinas indica a presença de cepa não toxigênica.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Bacci S, Mølbak K, Kjeldsen MK, et al. Binary toxin and death after Clostridium difficile infection. Emerg Infect Dis. 2011;17:976-82.
2. Broberg CA, Calder TJ, Orth K. Vibrio parahaemolyticus cell biology and pathogenicity determinants. Microbes Infect. 2011;13:992-1001.
3. Cantarelli,V, Nagayama, K, Takahashi A, et al. Isolation of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) serotype 091:H21 from a child with diarrhea in Porto Alegre city, RS, Brazil. Braz J Microbiol. 2000;31:266-70.
4. Chagla AH, Borczyk AA, Aldom JE, et al. Evaluation of the L--pyrrolidonyl-beta-naphthylamide hydrolysis test for the differentiation of members of the families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae. J Clin Microbiol. 1993;7:1946-8.
5. Hauswaldt S, Nitschke M, Sayk F, et al. Lessons Learned From Outbreaks of Shiga Toxin Producing Escherichia coli. Curr Infect Dis Rep. 2013;15:4-9.
6. Hodges K, Gill R. Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. Gut Microbes. 2010;1:4-21.
7. Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P. Emergence of Clostridium difficile-associated disease in North America and Europe. Clin Microbiol Infect. 2006;Suppl 6:2-18.
8. Marlovits TC, Stebbins CE. Type III secretion systems shape up as they ship out. Curr Opin Microbiol. 2010;13:47-52.

9. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin Microbiol Rev. 1998;11:142-201.
10. Sack DA, Sack RB, Nair GB, et al. Cholera. Lancet. 2004;363:223-33.
11. Sansonetti P. Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. Gut. 2002;50 Suppl 3:III2-8.
12. Versalovic J, et al. Manual of Clinical Microbiology. 10.ed. Washington: ASM PRess, 2011.
13. Wanahita A, Goldsmith EA, Musher DM. Conditions associated with leukocytosis in a tertiary care hospital, with particular attention to the role of infection caused by Clostridium difficile. Clin Infect Dis. 2002;34:1585-92.

34

capítulo

Carlos Augusto Albini ▪ Helena Aguilar Peres de Mello de Souza

Culturas de Amostras Genitais

INTRODUÇÃO

Muitos são os motivos que dificultam o diagnóstico das doenças sexualmente transmissíveis (DSTs). Alguns pacientes não procuram atendimento médico pela obrigatoriedade da comunicação de parceiros. Outros se automedicam, complicando ainda mais o diagnóstico. Tem sido possível observar casos em que ocorrem múltiplos parceiros, o que torna o quadro mais complicado ainda. A equipe de saúde tem observado a mudança de contexto das DSTs. O ressurgimento da sífilis e da blenorragia é inquestionável. Embora existam inúmeras campanhas visando à utilização de preservativos e a distribuição gratuita seja uma realidade, tem sido possível verificar que determinados grupos de pacientes, como os mais jovens e os mais idosos, não tem aderido ao apelo da utilização do preservativo. O sucesso no tratamento da AIDS parece justificar tal tendência.

As infecções do trato genital estão associadas a várias síndromes clínicas, dentre elas: vulvovaginite, vaginose bacteriana, cervicite, endometrite, salpingite e abscesso ovariano em mulheres. Em homens, temos epididimite e prostatite. A uretrite e as úlceras genitais podem acometer ambos os sexos. A maioria das situações clínicas é transmitida sexualmente, entretanto, algumas infecções não são disseminadas desta forma, como é o caso das vaginoses bacterianas e da candidíase (Tabela 34.1).

As doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) podem ter longos períodos assintomáticos, e a diferenciação entre infecções urogenitais não sexualmente transmissíveis (Tabela 34.2) e as DSTs não é, muitas vezes, clara, uma vez que os sintomas não são específicos e asinfecções mistas são bastante comuns. Por definição, as DSTs são transmitidas por intercurso sexual, mas também podem ser transmitidas indiretamente pelas mãos, por objetos sexuais ou pela mucosa, durante o sexo oral. Convém citar que algumas infecções não normalmente consideradas DSTs podem ser transmitidas pelo ato sexual, quando é comum o sangramento, como no caso das hepatites virais.

As DSTs são consideradas mundialmente um dos problemas de saúde mais comuns e, embora se desconheça sua real magnitude, estima-se que nos países em desenvolvimento constituam uma das cinco causas mais frequentes de busca por atendimento médico. A repercussão das sequelas em ambos os sexos, a relação com o aumento da morbidade e da mortalidade materna e infantil, o papel facilitador da transmissão sexual do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e do câncer genital estão amplamente documentadas, evidenciando a relevância das doenças.

A epidemiologia mundial das DSTs acha-se em constante transformação e, como exemplo, pode-se citar o aumento na incidência de sífilis, com início no ano 2000, e a epidemia europeia de linfogranuloma venéreo retal (LGV) em homens que fazem sexo com homens, começando em 2003, na Holanda. *A infecção por Chlamydia trachomatis* é endêmica na Europa e afeta principalmente os jovens, com pico de prevalência em mulheres de 15 a 25 anos de idade e em homens de 20 a 30 anos de idade.

No Brasil, uma pesquisa publicada em 2008 investigou a prevalência de DSTs em pessoas sexualmente ativas de seis capitais, divididas em três subpopulações: gestantes, homens trabalhadores de pequenas indústrias (supostamente assintomáticos) e pessoas de ambos os sexos que procuraram atendimento médico em clínicas de DST. Os micro-organismos pesquisados, as amostras clínicas analisadas e os testes laboratoriais utilizados no estudo constam da Tabela 34.3. A prevalência das DSTs nas diferentes populações é apresentada na Tabela 34.4. Os resultados da pesquisa revelaram, para cada subpopulação estudada:

1. Do total de gestantes incluídas no estudo, 11% (365/3.303) apresentavam uma infecção bacteriana; 37% (1.224/3.303) apresentavam uma infecção viral e 42% (1.288/3.303) apresentavam pelo menos uma das DSTs analisadas. Conforme os padrões estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), as DSTs representam um agravo importante de morbidade para as gestantes, já que a taxa de prevalência de sífilis nessa população é maior que 1%, a prevalência de DSTs não curáveis (virais) é maior que 5% e a prevalência de DSTs curáveis nas adolescentes ultrapassa 10%.
2. Do total de homens trabalhadores de indústrias, 5,2% (145/2.814) apresentavam uma DST curável (bacteriana), ainda que no grupo não tenha sido pesquisada a tricomoníase.

Tabela 34.1 Principais microrganismos responsáveis por doenças sexualmente transmissíveis e contexto clínico.

Microrganismo	Síndromes clínicas associadas	Doença assintomática	Complicações tardias	Transmissão vertical (mãe p/filho)
Neisseria gonorrhoeae[b]	Uretrite e/ou cervicite Infecção pélvica Proctite Infecção disseminada (artrite, lesões cutâneas, sepse)	Até 10% em homens Até 50% em mulheres Portadores faringeanos e retais	Infertilidade tubária Gravidez ectópica Dor pélvica crônica Estenose uretral	Conjuntivite perinatal (*ophtalmia neonatorum*)
Chlamydia trachomatis[b]	Uretrite, cervicite Doença inflamatória pélvica Síndrome de Fitz-Hugh-Curtis (peri-hepatite) Proctite LGV – (genótipo L) Artrite reativa adquirida sexualmente (SARA) Síndrome de Reiter (artrite reativa + conjuntivite + uretrite)	> 50% Portadores faringeanos e retais	Infertilidade tubária Gravidez ectópica Dor pélvica crônica	Conjuntivite Pneumonia Parto prematuro
Treponema pallidum[b]	Sífilis primária (cancro duro) Sífilis secundária Sífilis terciária	Cancro indolor com remissão espontânea (primária)	Neurológicas Cardíacas Ósseas	Aborto espontâneo Sífilis congênita
Haemophilus ducreyi[b]	Cancroide (cancro mole)	Não descrita	Fimose Deformidade (perda de substância)	Não descrita
Mycoplasma genitalium[b]	Uretrite masculina aguda, crônica ou recorrente Cervicite Infecção pélvica subaguda	> 30% em homens > 70% em mulheres	Infertilidade tubária (evidência indireta por sorologia)	Não descrita
Klebsiella granulomatis[b]	Donovanose (granuloma inguinal)	Não descrita	Obstrução linfática (pseudobubões inguinais no homem; elefantíase genital na mulher)	Não descrita
Trichomonas vaginalis[p]	Vaginite e/ou uretrite	Até 25% em mulheres 90% em homens	Raras	Risco de parto prematuro e infecção do neonato
Herpes simplex (tipos 1 e 2)[v]	Úlceras recorrentes	Frequente	Neuralgia na área afetada	Herpes neonatal (infecção sistêmica)
Vírus da imunodefici-ência humana (HIV)[v]	Infecção primária Ausência de sintomas genitais locais	Fase de latência média de 9 anos sem tratamento	Aids	Principalmente perinatal
Vírus da hepatite B (HBV)[v]	Ausência de sintomas genitais locais Hepatite ictérica aguda em 10% dos casos Fulminante em 0,1%	Portadores assintomáticos	Hepatite crônica Cirrose hepática Câncer hepático	Principalmente perinatal

b = bactéria; p = protozoário; v = vírus.

Fonte: Adaptada de Barbeyrac e Skov-Jensen, 2012.

Tabela 34.2 Principais microrganismos responsáveis por infecções urogenitais (não sexualmente transmissíveis) e seu contexto clínico.

Microrganismo	Sintomas em mulheres	Sintomas em homens	Complicações tardias	Transmissão vertical
Mycoplasma hominis	Associado com vaginose, mas não é uma causa	Ausentes	Infecção do trato superior em mulheres (sugerido)	Casos raros de meningite em neonatos de baixo peso associados com corioamnionite
Ureaplasma spp.	Síndrome uretral (sugerido)	Uretrite quando presente em grandes quantidades, mas o isolamento não é preditivo de doença	Não associado	Casos raros de meningite em neonatos de baixo peso; infecção intrauterina associada com parto prematuro
Vaginose bacteriana (ausência de lactobacilos; supercrescimento de microbiota anaeróbia mista)	Corrimento vaginal (fétido)	Uretrite em parceiros masculinos (sugerido)	Desconhecidas	Aborto espontâneo; parto prematuro; doença inflamatória pélvica pós-aborto induzido e cirurgia vaginal
Streptococcus spp. e *Staphylococcus* spp.	Vaginite		Não documentadas	*Streptococcus agalactiae:* sepse ou meningite neonatal
Candida spp.	Vulvovaginite	Balanite	Candidíase vulvo-vaginal recorrente	Não documentada

Fonte: Adaptada de Barbeyrac e Skov-Jensen, 2012.

3. Os homens e as mulheres que procuraram atendimento em clínicas de DSTs apresentaram prevalência de 51% (1.636/3.210) para todas as DSTs investigadas, 14,4% (462/3.210) para DSTs bacterianas, e 41,9% (1.344/3.210) para as DSTs virais. A prevalência de DSTs sintomáticas e assintomáticas associadas evidenciou alta probabilidade de infecção, mesmo que não tenham sido incluídas no estudo todas as DSTs.
4. As maiores taxas de infecção gonocócica e por clamídia foram encontradas na população mais jovem, entretanto, em relação à sífilis, ao HIV e ao HBV, foram observados em pessoas com idade mais elevada.
5. A prevalência de HPV é elevada em ambos os sexos, porém, nos homens predominam os tipos de médio ou baixo risco, enquanto nas mulheres predominam os tipos de alto risco. A infecção afeta fundamentalmente adolescentes e jovens, sugerindo que se estabeleça em tenra idade, no início da prática sexual.

Outra pesquisa divulgada pelo Ministério da Saúde em 2009 mostrou que 10,3 milhões de brasileiros já tinham apresentado algum sinal ou sintoma de DST, em um total de 6,6 milhões de homens e 3,7 milhões de mulheres. Segundo a instituição, 18% dos homens e 11,4% das mulheres não procuravam tratamento de qualquer tipo. As complicações dessas doenças aumentaram em 18 vezes o risco de infecção pelo vírus HIV.

Segundo a OMS, dentre as mulheres infectadas por *Neisseria gonorrhoeae* e/ou clamídia não tratadas, 10% a 40% desenvolvem doença inflamatória pélvica (DIP); destas, mais de 25% se tornarão inférteis. Dados de países desenvolvidos indicam que mulheres que tiveram DIP têm probabilidade 6 a 10 vezes maior de desenvolver gravidez ectópica. Nos países em desenvolvimento, a gravidez ectópica contribui com mais de 15% das mortes maternas. Aborto espontâneo, baixo peso ao nascer, infecção congênita e perinatal são comorbidades associadas às DSTs não tratadas em gestantes. Entre homens, as infecções por clamídia também podem causar infertilidade.

Tabela 34.3 Diagnóstico segundo testes e materiais utilizados na pesquisa.

Diagnóstico	Teste	Material
Neisseria gonorrhoeae *Chlamydia trachomatis*	TAAN Captura híbrida	Homens: urina Mulheres: cervicovaginal
HPV	Captura híbrida	Homens: raspagem do sulco balano-prepucial Mulheres: raspagem do ectocérvix, fundo de saco posterior e vulva
Haemophilus ducreyi *Treponema pallidum* HSV2	TAAN	Raspagem das úlceras
Trichomonas vaginalis	TAAN	Homens: urina Mulheres: secreção vaginal
Vaginose bacteriana Candidíase	Gram Teste de Whiff (KOH) pH	Secreção vaginal
Sífilis latente	RPR ELISA confirmatório	Sangue/soro
Hepatite B	ELISA	Sangue/soro
HIV	ELISA *Western-Blot* confirmatório	Sangue/soro

Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde, 2008.

Tabela 34.4 Prevalência de DST em diferentes grupos populacionais de seis capitais brasileiras, pesquisa de 2005.

DST	Gestantes	Homens trabalhadores de indústrias	Mulheres que procuraram atendimento	Homens que procuraram atendimento
Sífilis	2,6	1,9	3,4	3,3
Gonorreia	1,5	0,9	3,3	18,5
Clamídia	9,4	3,4	7,3	13,1
HIV	0,5	-	0,6	1,7
HBV	0,9	0,9	0,7	1,6
HPV	40,4	-	44,7	32,6

Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde, 2008.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS INFECÇÕES GENITAIS

Os testes mais utilizados nos laboratórios clínicos para o diagnóstico etiológico das infecções genitais estão listados na Tabela 34.5.

A maioria das amostras genitais recebidas no laboratório de microbiologia é contaminada com micro-organismos da microbiota da pele e mucosas, entretanto, patógenos como *Haemophilus ducreyi*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum* e *Chlamydia trachomatis* são sempre significativos. Outros micro-organismos serão considerados patogênicos somente em

Tabela 34.5 Infecções genitais, principais agentes etiológicos e diagnóstico laboratorial.

Infecção	Agentes	Diagnóstico laboratorial
Sífilis (cancro duro)	*Treponema pallidum*	Pesquisa direta (campo escuro, PCR)
Sífilis secundária	*Treponema pallidum*	Testes sorológicos (RPR e ELISA)
Cancro mole	*Haemophilus ducreyi*	Bacterioscopia, PCR
Donovanose	*Klebsiella granulomatis*	Biópsia
Linfogranuloma venéreo (LGV)	*Chlamydia trachomatis*	Clínico, PCR
Herpes	Vírus Herpes simplex	Clínico, PCR
Uretrite e cervicite	*Neisseria gonorrhoeae*	Bacterioscopia e cultura
	Chlamydia trachomatis	PCR
Vulvovaginite	*Neisseria gonorrhoeae*	Bacterioscopia e cultura
	Chlamydia trachomatis	PCR
	Candida albicans	Exame direto
	Trichomonas vaginalis	Exame direto
Vaginose bacteriana	Supercrescimento da microbiota anormal + microbiota anaeróbia + *Gardnerella vaginalis*	Bacterioscopia Teste de Whiff
Endometrite	*Enterobacteriaceae* Estreptococos A e B Enterococos Microbiota mista anaeróbia	Bacterioscopia e cultura
Salpingite	*Neisseria gonorrhoeae*	Bacterioscopia e cultura
	Chlamydia trachomatis	PCR
	Microbiota mista aeróbia e anaeróbia	
Abscesso pélvico	Microbiota mista aeróbia e anaeróbia	Bacterioscopia e cultura
Epididimite	*Neisseria gonorrhoeae* *Enterobacteriaceae* *Pseudomonas aeruginosa* Cocos Gram-positivos	Bacterioscopia e cultura
	Chlamydia trachomatis	PCR
Verrugas genitais (condiloma)	Papilomavírus humano	Clínico, biópsia

Fonte: Adaptada de Baron e Thomson, 2011.

determinadas situações clínicas, dentre eles: micoplasmas, ureaplasmas, *Staphylococcus aureus,* estreptococos β-hemolíticos, enterobactérias e bactérias anaeróbias.

As culturas de amostras genitais não são muitas solicitadas pelos clínicos, devido à maioria das manifestações clínicas serem bastante sugestivas. A baixa sensibilidade de alguns testes diagnósticos, assim como a possibilidade de uma abordagem terapêutica sindrômica, são fatores que contribuem para a não licitação da cultura em algumas situações. O microbiologista, ao interpretar uma cultura de amostra genital, deverá considerar o tipo de amostra, a microscopia direta do material pela coloração de Gram e a quantidade relativa do potencial patógeno em relação ao crescimento da microbiota normal. Isso ajuda a determinar quais isolados serão identificados e testados quanto à suscetibilidade a antimicrobianos.

Em resumo, os isolados de amostras presumidamente estéreis (abscessos fechados) e patógenos isolados em cultura pura ou predominantes em amostras contendo microbiota e polimorfonucleares deveriam ser identificados e realizado o antibiograma quando aplicável. Bactérias anaeróbias em culturas mistas não requerem identificação individual, na maioria dos casos. Deve-se evitar a prática de "identificar tudo que for encontrado" em todas as amostras, pois o relato desnecessário de micro-organismos, além do custo excessivo, pode contribuir para o tratamento inadequado dos pacientes.

A qualidade das amostras afeta a qualidade dos resultados e a informação clínica influencia a interpretação; assim, uma comunicação adequada entre o laboratório e o clínico é essencial. A seguir, algumas considerações sobre amostras genitais destinadas ao diagnóstico microbiológico:

- **Amostra uretral**: deve ser sempre obtida de uma a três horas após a última micção, e sempre antes da coleta do primeiro jato urinário.
- **Amostras vaginais e endocervicais**: após a colocação do espéculo lubrificado com solução salina e limpeza do excesso de muco cervical, um *swab* deve ser inserido apenas 0,5 cm dentro do canal cervical e esfregado sobre uma lâmina; o mesmo *swab* pode ser colocado em seguida em meio de transporte para cultura de *N. gonorrhoeae*. Um segundo *swab* é inserido de 0,5 a 1,0 cm no canal e mantido no local por 10 segundos e rodado 2 vezes para as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (TAAN) para *C. trachomatis, N. gonorrhoeae* e/ou micoplasmas e ureaplasmas. A secreção do fórnix vaginal posterior é coletada com *swab* ou alça para pesquisa de vaginose bacteriana, tricomoníase e candidíase por microscopia e teste de Whiff.
- **Amostras de úlceras**: são obtidas do centro da lesão (fluido seroso), para pesquisa de treponemas; dos bordos (pus), para pesquisa de *H. ducreyi*, e da base da lesão (células), para pesquisa de *C. trachomatis* (LGV) e do vírus do herpes simplex.
- **Amostras específicas de gestantes**: para pesquisa de portadoras de estreptococos do grupo B (*S. agalactiae*), um *swab* é introduzido no terço inferior da vagina entre a 34ª e a 35ª semanas de gestação; o mesmo *swab* é introduzido no canal retal e colocado em meio seletivo.
- **Amostras específicas de homens**: em caso de epididimite ou prostatite, a secreção uretral (quando presente) ou o primeiro jato urinário devem ser coletados para pesquisa de clamídia, gonococos e micoplasmas; a cultura de sêmen ou fluido prostático obtidos após massagem prostática não fornece resultados confiáveis.
- **Amostras de orofaringe e retais**: devido à epidemia europeia de LGV retal entre HSH (homens que fazem sexo com homens), caracterizado por proctite ulcerativa com secreção purulenta ou hemorrágica, simulando doença inflamatória intestinal ou carcinoma retal, recomenda-se atualmente que todos os HSH com proctite sejam examinados por testes de amplificação de ácidos nucleicos (TAAN) para clamídia. A prevalência de LGV em HSH foi determinada por um estudo multicêntrico realizado na Alemanha que encontrou altas taxas de infecção, muitas delas assintomáticas.
- **Primeiro jato urinário:** no caso de uretrite crônica ou recorrente, na ausência de secreção uretral, o primeiro jato de urina da primeira micção da manhã é o material de escolha para o diagnóstico.
- **Amostras de vítimas de violência sexual:** no atendimento a mulheres, que correspondem à maioria dos casos, o Programa Nacional de DST/Aids recomenda que se coletem amostras de conteúdo vaginal para exame direto a fresco e corado pelo Gram, de endocérvice e reto para cultura de gonococo e de endocérvice para pesquisa de clamídia.

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO POR SÍNDROME

Sífilis/cancro duro

Exame direto

A pesquisa direta do *T. pallidum,* agente etiológico da sífilis, deve ser realizada pela técnica de campo escuro, utilizando-se microscópio específico. A técnica requer uma coleta específica com debridamento da lesão. A maior dificuldade observada é que a maioria dos laboratórios clínicos atualmente não possui o microscópio com o condensador adequado tal realizar o procedimento. Outro fator a ser considerado é a necessidade de realizar a imediata observação microscópica, em um tempo máximo de vinte minutos após a coleta. Variações bruscas de temperatura devem ser evitadas. Os observadores devem estar familiarizados e ser treinados para observar a característica peculiar do movimento do *T. pallidum*. As lâminas devem ser observadas por, no mínimo, 10 minutos antes de serem consideradas negativas. A sensibilidade máxima da pesquisa é obtida quando é realizada por três dias consecutivos. Uma alternativa seria enviar as amostras para um centro específico que tenha o microscópio adequado com um microbiologista treinado. Amostras obtidas das mucosas oral e anal não são adequadas para a observação de

espiroquetas pela técnica de microscopia em campo escuro, pois inúmeros micro-organismos espiralados da microbiota normal oral e anal podem ser confundidos. Técnicas de imunofluorescência direta (IFD) têm sido descritas, permitindo adequada observação dos espiroquetas, no entanto, a acessibilidade aos kits têm sido difícil.

Cultura

O Treponema pallidum não pode ser cultivado em laboratórios clínicos pelas dificuldades operacionais do cultivo. Muitos laboratórios não possuem microscópio com condensador de campo escuro; assim sendo, o diagnóstico laboratorial da sífilis acaba sendo realizado por métodos sorológicos. Tais testes são baseados em metodologias não treponêmicas (VDRL, RPR, USR e TRUST, entre outras) e metodologias treponêmicas como imunoenzimoensaio (ELISA/EIA); ensaio imunológico com quimioluminescência (EQL); imunofluorescência indireta (FTA-Abs); aglutinação e hemaglutinação (TPPA, TPHA e MHATP); imunocromatografia teste rápido e Western Blot (WB). A metodologia sorológica acha-se bem estabelecida e padronizada pelo Ministério da Saúde pela Portaria nº 3.242/2011.

Cancro mole

Exame direto

A pesquisa *direta* do *H. drucreyi* é realizada pela coloração de Gram. Na grande maioria das DSTs, é útil a realização do método de Gram. Trata-se de uma técnica disponível, rápida e de baixo custo. Os cuidados na coleta são fundamentais. Devem ser utilizadas lâminas novas e desengorduradas. Na confecção do esfregaço, devem ser observados alguns cuidados. A preparação deve apresentar uma fina espessura. Deve-se evitar espalhar demasiadamente o material, como é rotina na Microbiologia, para não alterar a morfologia típica dos micro-organismos. A coloração de May-Grünwald-Giemsa também pode ser empregada. O aspecto típico do *H. drucreyi* é de pequenas cadeias de cocobacilos Gram-negativos, com tendência ao paralelismo. A TAAN, como a PCR (reação em cadeia da polimerase) é considerada o padrão-ouro pelo Ministério da Saúde, embora seja reconhecido o elevado custo da prova. Deve ser realizado diagnóstico diferencial com sífilis (cancro duro).

Cultura

As amostras adequadamente obtidas, desde que não possam ser imediatamente inoculadas, devem ser conservadas em meio de transporte de Amies ou meio de THIO-hemina, contendo L-glutamina e albumina. A maneira mais adequada de serem transportadas ou conservadas é na temperatura de refrigeração (4 °C a 8 °C). Deve ser utilizado um meio de cultura seletivo. Acham-se disponíveis: Ágar Base GC adicionado de Suplemento VX, 5% de soro fetal bovino, 1% de hemoglobina, e 3 μg de vancomicina/mL. Outra opção é utilizar Ágar Chocolate com 5% de sangue de cavalo, Suplemento VX 1% e 3 μg de vancomicina/mL. Incubar as placas em atmosfera de 5% de CO_2, de 33 °C a 34 °C. Observar o crescimento após 48 horas de incubação. Não descartar antes de cinco dias. As colônias após incubação de dois dias apresentam-se com 2 mm de diâmetro e, quando tocadas com a alça bacteriológica, se desprendem com facilidade. São catalases negativas e não crescem em Ágar MacConkey. Apresentam a prova de oxidase positiva após 15 a 20 segundos. Podem ser utilizadas provas adicionais como a suscetibilidade a SPS, a prova de dispersão celular com Tween 80 e a prova da alanina.

Linfogranuloma Venéreo (LGV)

Exame direto

Não se aplica. As TAANs acham-se preconizadas. As técnicas de imunofluorescência não são indicadas porque reagem com anticorpos contra todas as infecções por clamídia, ocorrendo assim reação cruzada com uretrite, cervicite, conjuntivite, psitacose e tracoma.

Cultura

Não é realizada no laboratório de análises clínicas. O diagnóstico é clínico. O LGV é causado por diferentes sorotipos de *C. thachomatis,* L1, L2 e L3, diferentes dos sorotipos envolvidos em uretrites não gonocócicas (UNG).

Donovanose (granuloma inguinal ou granuloma venéreo)

Exame direto

Utiliza-se o material dos bordos da úlcera obtido por biópsia. O micro-organismo causador, o *Klebsiella granulomatis*, é mais bem evidenciado em células mononucleares e são denominados corpúsculos de Donovan. Pode-se utilizar a coloração de Whrigt ou Giemsa. Apresentam-se como bacilos agrupados intracelulares.

Cultura

Não se aplica. O micro-organismo apresenta muita dificuldade de se desenvolver em meios artificiais.

Corrimento uretral

Exame direto

A uretrite é diagnosticada pela presença de cinco ou mais leucócitos polimorfonucleares (PMN) por campo de maior aumento (1.000×), observados em, pelo menos, quatro campos de observação. No sedimento do primeiro jato de urina considera-se pelo menos 10 PMN em 400× de aumento. O material obtido de maneira adequada deve ser corado pelo Gram, visando à observação de diplococos Gram-negativos (DGN) intra e/ou extracelulares. No corrimento uretral, o micro-organismo mais comum é o *N. gonorrhoeae.* A observação de DGN em pacientes masculinos sintomáticos apresenta

sensibilidade de 98% e especificidade de 100%. A visualização bacterioscópica de DGN em pacientes do sexo feminino apresenta baixa sensibilidade e especificidade pela presença de microbiota variada, muitas vezes composta por diplococos ou diplobacilos Gram-negativos como *Moraxella* spp., *Acinetobacter* spp. e anaeróbios. Existem testes imunológicos e TAAN para pesquisa de *N. gonorrhoeae* disponíveis comercialmente.

Cultura

O material coletado de maneira adequada deve ser imediatamente semeado no meio de cultura, indicado ou inoculado no meio de Transporte de Stuart, Amies ou similar. Recomendam-se meios enriquecidos com variados fatores de crescimento. O Meio de Thayer Martin pode ser utilizado, assim como o de Ágar Chocolate suplementado com suplemento VX ou similar, acrescido de inibidores de contaminantes. Os mais utilizados contêm vancomicina, colistina, nistatina e trimetoprim (VCNT), em concentrações padronizadas, e podem ser obtidos comercialmente. As placas retiradas da geladeira, antes da utilização, devem ficar em temperatura ambiente por tempo adequado para atingir temperatura adequada. Incuba-se por até 48 horas a 35 °C a 36 °C. Recomenda-se uma atmosfera de 3% a 10% de CO. A umidade recomendada é de 70% a 80%. As colônias devem ser observadas a partir das 24 horas. Recomenda-se realizar a prova da oxidase e a coloração de Gram. Uma colônia pequena e translúcida que ao Gram se apresente como DGN e tenha se desenvolvido em um meio seletivo contendo VCNT, sendo oxidase positiva, provavelmente é gonococo.

A identificação definitiva requer a fermentação de açúcares em Ágar Trypticase Cisteína contendo 1% de glicose, maltose, lactose e sacarose. *Neisseria gonorrhoeae* fermenta apenas a glicose. Os meios não devem ser incubados em CO_2. A leitura é realizada no ápice do tubo. Comercialmente, acham-se disponíveis testes rápidos de degradação de substratos, sistemas rápidos cromogênicos, sistemas de provas bioquímicas combinadas e métodos de sonda de DNA. Deve ser verificado se tais *kits* possuem registro na ANVISA. Existem disponíveis comercialmente variados métodos imunológicos visando à identificação de *Neisseria*. No caso da *N. gonorrhoeae*, não se recomenda rotineiramente a realização de testes destinados à verificação da resistência. Na falha terapêutica, devem ser testados ceftriaxona, cefixime, ciprofloxacino e tetraciclina.

A cultura para micoplasmas requer meios de transporte como SP-4, A3XB ou caldo arginina, entre outros disponíveis comercialmente. São realizadas diluições seriadas do meio inoculado. As amostras são semeadas em meio sólido, como o Ágar A8 incubado em atmosfera de CO_2 a 36 °C, por até 96 horas. Os meios devem ser adicionados de antimicrobianos, visando inibir o crescimento microbiano indesejável. A partir do aspecto de delicadas colônias, que variam de 15 a 60 µm, no caso de *Ureaplasma* spp. e de 200 a 300 µm, em se tratando de *Mycoplasma hominis* (portanto, invisíveis a olho nu), é realizada a provável identificação. Diversos kits comerciais estão disponíveis para cultivo, quantificação e identificação de micoplasmas e ureaplasmas. Alguns permitem a verificação da resistência a antimicrobianos. Deve ser realizada urocultura para afastar o diagnóstico de infecção do trato urinário.

Uretrite Não Gonocócica (UNG)

Na ausência de gonococos, deve ser pesquisada *C. trachomatis* por TAAN. Os testes de imunofluorescência direta e ELISA apresentam baixa especificidade. A metade das UNGs não apresenta resultado microbiológico satisfatório. Ureaplasmas podem ser agentes de pequeno número das uretrites, principalmente quando o inóculo encontrado é maior que 10.000 UFC/mL. Duas espécies principais acham-se implicadas, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*. A presença de tais micro-organismos ainda é controversa e requer mais estudos. A dificuldade de cultivar e quantificar os micoplasmas pode explicar e justificar as dificuldades de validação da presença do micro-organismo. Existem relatos de pesquisas de *Micoplasma hominis* e muitos laboratórios rotineiramente relatam tal micro-organismo. *Trichomonas vaginalis* pode apresentar discreta secreção matinal em pacientes do sexo masculino.

Corrimento vaginal/cervicite

Exame direto

Realiza-se a coloração de Gram para verificar a presença de hi*fas, DGN*, clue cells (células-alvo) e o exame a fresco com soro fisiológico, visando à *observação de T. vaginalis*, utilizando-se objetivas de pequeno ou médio aumento (10 a 40×). O teste de aminas (teste de Whiff) é simples, rápido e útil, sendo muito utilizado no diagnóstico laboratorial da vaginose bacteriana. Consiste em colocar uma gota da secreção vaginal em uma lâmina de microscopia e adicionar uma gota de KOH a 10%. Mistura-se e verifica-se o odor desprendido. O teste considerado positivo fornece odor semelhante a peixe. A pesquisa de *C. trachomatis* deve ser realizada por TAAN, disponível comercialmente.

Cultura

A cultura para *T. vaginalis* pode ser valiosa em crianças, entretanto, é de difícil execução. Utiliza-se o meio de Diamond e a incubação requer condições de anaerobiose. Pode ser utilizada nos casos de difícil diagnóstico. Não é realizada como rotina no laboratório clínico. O padrão-ouro para o diagnóstico é a TAAN, ainda de restrito acesso. A pesquisa de *C. trachomatis* deve ser realizada por TAAN, disponível comercialmente. A cultura para gonococos deve ser realizada segundo os critérios já discutidos.

Vulvovaginite/Vaginose bacteriana/Candidíase/Tricomoníase

Exame direto

A coloração de Gram pode ser realizada para observação de leveduras, embora a pesquisa a fresco direta com KOH a 10% seja mais adequada e apresente maior sensibilidade. Pode

ser utilizado no exame a fresco, com microscópio com contraste de fase. A observação de *T. vaginalis* pode ser realizada com soro fisiológico. Em pacientes do sexo feminino, a sensibilidade do método é adequada, mas, nos pacientes masculinos, a sensibilidade é baixa. A coloração de Gram permite ao observador treinado a visualização do parasita flagelado, principalmente quando o esfregaço é realizado de maneira adequada, sem alterar demasiadamente a morfologia do micro-organismo. A coloração de Gram permite a observação das *clue cells,* células contendo grande quantidade de bacilos Gram-negativos (BGN) curtos, características de *Gardnerella vaginalis.* A coloração de Gram permite quantificar a microbiota vaginal e o equilíbrio. Permite, ainda, estabelecer o escore de Nugent (Tabela 34.6). A microbiota normal apresenta escore de 0 a 3, na maioria lactobacilos. Microbiota intermediária apresenta escore de 4 a 6, traduzidos por poucos lactobacilos e presença de variados morfotipos. Na vaginose bacteriana, o escore observado é de 7 a 10, demostrando a ausência de lactobacilos e a presença de outros morfotipos microbianos.

Cultura

A cultura não contribui para o diagnóstico laboratorial da vaginose, na maioria das vezes podendo ser utilizada em situações especiais de pesquisa, como na necessidade de conhecer a espécie e o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Apresenta aplicação quando é observada dificuldade no tratamento e nas candidíases de repetição. O cultivo não fornece dificuldade pelas características nutricionais e de desenvolvimento favoráveis do micro-organismo. Os meios de cultura normalmente utilizados para fungos funcionam bem para o patógeno.

Doença inflamatória pélvica (útero, tubos ovarianos e cavidade pélvica)

Exame direto

Dentre os agentes implicados na doença inflamatória pélvica (DIP), destacam-se as neisserias, clamídias, micoplasmas, ureaplasmas, anaeróbios e estreptococos β-hemolíticos. Apenas para neisserias é útil a pesquisa direta pelo Gram. Como deve ser realizado o diagnóstico diferencial de ITU, o exame da gota de urina não centrifugada (GUNC) pode representar papel relevante.

Cultura

A cultura aplica-se para a pesquisa de *N. gonorrhoeae*, *Streptococcus pyogenes,* e, em situações especiais, determinados anaeróbios. Igualmente, é preconizada para descartar ITU na cultura de urina. No caso, recomenda-se a escolha da alça calibrada adequada a partir da observação inicial da GUNC e a realização do antibiograma. O cultivo para gonococos segue as recomendações anteriores. A cultura para *S. pyogenes* não requer cuidado especial, desde que seja utilizado um ágar sangue adequado. A identificação pode ser realizada presuntivamente pelo disco de bacitracina, sendo confirmada por sorologia. Cuidados especiais devem ser empregados, desde a coleta, o transporte e a semeadura primária em meios pré-reduzidos, quando da necessidade do isolamento de micro-organismos anaeróbios,. A incubação deve ser na ausência de oxigênio por pelo menos 48 horas, a 36 °C. O procedimento não é rotineiro em laboratórios clínicos, sendo realizado em laboratórios de referência. Na topografia estudada, bactérias anaeróbias em culturas mistas não são representativas, na maioria dos casos.

Pesquisa de estreptococos do grupo B de Lancefield (EGB) – *S. agalactiae* em gestantes

Exame direto

Não tem valor a pesquisa direta pela coloração de Gram pela variada microbiota vaginal. Testes imunológicos rápidos para pesquisa de EGB acham-se disponíveis comercialmente.

Cultura

O material vaginal ou retal adequadamente coletado é inoculado em Caldo Todd-Hewitt (adicionado ou não de 5% de sangue de carneiro desfibrinado) contendo antimicrobia-

Tabela 34.6 Avaliação da microbiota vaginal pela coloração de Gram: escore de Nugent (0 a 10).

Escore	*Lactobacillus* (bacilos grandes Gram-positivos)	*Gardnerella* (bacilos pequenos Gram-variáveis)	*Mobiluncus* (bacilos Gram-variáveis curvos)
0	> 30	0	0
1	5-30	< 1	1-5
2	1-4	1-4	> 5
3	< 1	5-30	
4	0	> 30	

OBS.: A observação microscópica ocorre em imersão (1.000×), pelo menos em três campos. Exemplo da utilização do escore: < 1 lactobacilo (3), 25 morfotipos de *Gardnerella* (3), >5 bacilos curvados (2) = **escore 8** que indica vaginose bacteriana.

Fonte: Adaptada de Barbeyrac e Skov-Jensen, 2012.

nos. Deve-se utilizar gentamicina (8 μg/mL) e ácido nalidíxico (15 μg/mL) para inibir a microbiota genital. Igualmente, é preconizada a utilização de colistina (10 μg/mL) juntamente com ácido nalidíxico (15 μg/mL), incubando-se por uma noite. Subculturas são realizadas em ágar com sangue de carneiro. As colônias típicas, β-hemolíticas e catalase negativa são submetidas ao teste de CAMP (identificação presuntiva). Acham-se disponíveis meios seletivos de enriquecimento acrescidos de cromógenos. Na presença do EGB, ocorre mudança de cor do meio de cultura após a incubação preconizada. Existem *kits* disponíveis comercialmente, visando ao isolamento e à identificação bioquímica de EGB. Recomenda-se a utilização de *kits* para identificação sorológica (confirmatória) de estreptococos hemolíticos.

Antibiograma

Não é recomendável de rotina. Quando a paciente apresenta episódios de severa alergia às penicilinas, a eritromicina e a clindamicina podem ser testadas. Recomenda-se relatar apenas o resultado da clindamicina.

Endometrite, abscesso pélvico e salpingite

Exame direto

A coloração de Gram, desde que realizada por profissional treinado, fornece informações extremamente úteis na pesquisa de micro-organismos facultativos e anaeróbios implicados nos processos descritos. Numerosos micro-organismos facultativos e anaeróbios podem estar implicados: *Peptostreptococcus, Prevotella* spp., alguns *Bacteroides* spp., entre os anaeróbios. Nos facultativos, destacam-se: *G. vaginalis,* EGB, Enterococos, *Escherichia coli,* outras enterobactérias e *Staphylococcus aureus.* Micro-organismos não detectáveis pela bacterioscopia, como micoplasmas, ureaplasmas e clamídias, podem igualmente estar implicados nos processos infecciosos acima, assim, métodos imunológicos e de TAAN podem ser úteis na elucidação do processo infeccioso.

Cultura

Recomendam-se as metodologias anteriores expostas para pesquisa de facultativos e anaeróbios, assim como a realização do antibiograma no isolamento de micro-organismos de mecanismo de resistência emergente.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Abramson C. Cumitech 4 A. Laboratory Diagnosis of Gonorrhea. Washington: ASM Press, 1993.
2. Albini CA, Souza HAPHM, Silveira ACO. Infecções Urinárias. Uma Abordagem Multidisciplinar. Curitiba: Editora CRV, 2012.
3. Barbeyrac B, Skov-Jensen J. Sexually transmitted infections. In: Cornaglia G, et al. European Manual of Clinical Microbiology. 1.ed. France: Epernay, 2012. p.182.
4. Baron EJ, Thomson RB. Specimen Collection, Transport and Processing: Bacter iology. In: Versalovic J. Manual of Clinical Microbiology. 10.ed. Washington: ASM Press, 2011. p.253-54.
5. Baron EJ. Cumitech 17 A. Laboratory Diagnosis of Female Genital Tract Infections. Washington: ASM Press, 1993.
6. Brasil. Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. Brasília: Minis- tério da Saúde, 2006.
7. Brasil. Portaria 3.242, de 30 de dezembro de 2011. Minis- tério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
8. Brasil. Prevalências e frequências relativas de Doenças Se- xualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. Revised Guidelines from CDC, 2010. MMWR. 2010;59(No. RR-10):32.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2012. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, 2013.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement (M100-S23). Wayne, 2013.
12. DSTs atingem mais de 10 milhões de brasileiros, diz Ministério da Saúde. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://g1.globo.com/Noticias/Brasil/0,MUL1271014-5598,00-DSTS+ATINGEM+MAIS+DE+MILHOES+DE+BRASILEIROS+DIZ+MINISTERIO+DA+SAUDE.html
13. Garcia LS. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3.ed. Washington: ASM Press, 2010.
14. Gleaves CA. Cumitech 19A. Laboratory Diagnosis of Chlamydia trachomatis Infections. Washington: ASM Press, 1999.
15. Haar K, Dudareva-Vizule S, Wisplinghoff F, et al. Lymphogranuloma venereum in men screened for pharyngeal and rectal infection, Germany. Emerg Infect Dis. 2013;19(3):488-92.
16. Lagergard T, Bölin I, Lindholm L. On the evolution of the sexually transmitted bacteria Haemophilus ducreyi and Kleb- siella granulomatis. Ann NY Acad Sci. 2011 Aug;1230:E1-E10.
17. Nolte FS. Cumitech 34. Laboratory Diagnosis of Mycoplasmal Infections. Washington: ASM Press, 1993.
18. Nugent RP, Krohn MA, Hilleier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. J Clin Microbiol. 1991;29(2):297-301.
19. Organização Mundial da Saúde. Global Strategy for STI Prevention and Control Meeting. Genebra, 2004.
20. Stinghen AEM, Albini CA, Souza HAPHM. Coloração de Gram. Como fazer, interpretar e padronizar. Curitiba: Microscience, 2002.
21. DST no Brasil. (Internet) (acesso em 03/05/2017) Disponível em www.aids.gov.br/pagina/dst-no-brasil

35

capítulo

Juliana Caierão ▪ Alessandro Conrado de Oliveira Silveira

Cultura de Secreções do Trato Respiratório

Considerando o sítio anatômico em questão, as infecções de trato respiratório podem ser divididas em infecções de trato respiratório superior e inferior. Elas diferenciam-se consideravelmente em termos de gravidade, apresentação e manejo da doença, e agentes etiológicos envolvidos. Por esse motivo, serão tratadas separadamente neste capítulo.

INFECÇÕES DE TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR

Introdução

As infecções do trato respiratório superior estão entre as mais frequentes em crianças e adolescentes, geralmente levando a quadros autolimitados, mais comumente associados com vírus e, muitas vezes, sem receber um diagnóstico microbiológico mais acurado. Apesar de serem consideradas infecções triviais, com taxas de mortalidade baixas ou nulas, apresentam grande impacto econômico, limitando a capacidade de trabalho e aprendizado.

Em virtude da etiologia predominantemente viral, especialmente nas faringites, usualmente os clínicos dispensam a solicitação de culturas, realizando o diagnóstico baseados exclusivamente na sintomatologia do paciente. Aliado a este fato, a demora no resultado das culturas (variando entre 24 a 72 horas), induz o início da terapêutica antimicrobiana empírica, fazendo com que muitos pacientes utilizem antimicrobianos sem evidência de infecção bacteriana. Esse uso inadequado de antimicrobianos, além do prejuízo para o próprio paciente, pode auxiliar no aumento das taxas de resistência bacteriana.

Nesse sentido, o papel do laboratório de microbiologia clínica é fundamental para a orientação terapêutica. Testes preliminares como, por exemplo, microscopia corada pelo Gram produzem informações que, apesar de subjetivas e qualitativas, auxiliam o clínico na tomada de decisão e evitam antibioticoterapia desnecessária.

Alguns testes rápidos foram desenvolvidos a fim de minimizar o problema de tempo, orientando o clínico na real necessidade do uso de antimicrobianos para o paciente.

Otites

Introdução

Ao contrário das outras infecções do trato respiratório superior, as otites geralmente são causadas por bactérias. São caracterizadas por um processo inflamatório do ouvido médio ou externo, levando a um quadro clínico típico, com relato de dor intensa, exsudato inflamatório, febre e irritabilidade. Pode ocasionar um rompimento de tímpano e, em casos mais graves, levar à perda total ou parcial da audição. Estão entre as infecções mais comuns na infância, sendo infrequentes em adultos. Como as evidências clínicas são muito sugestivas, o diagnóstico etiológico é útil para orientar a terapêutica antibacteriana, visto que as bactérias isoladas podem apresentar resistência aos agentes terapêuticos mais comumente utilizados.

Agentes etiológicos

As otites externas estão associadas às bactérias que causam infecções de pele, como *Staphylococcus aureus* e *Propionibacterium acnes*. Em crianças, especialmente naquelas que frequentam piscinas, o isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* pode ser corriqueiro. Outras bactérias Gram-negativas, como *Proteus mirabilis*, também podem estar relacionadas à otite externa. Os agentes mais comumente isolados das infecções de ouvido médio são *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. Dentre os agentes mais incomuns podemos citar *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Alloicoccus otitis*, micobactérias, bactérias anaeróbias.

Processamento

Inicialmente é imprescindível que seja realizada uma bacterioscopia, a fim de, além de verificar os morfotipos bacterianos presentes, avaliar a qualidade da amostra recebida. Amostras com poucos leucócitos podem ser sugestivas de contaminação e o crescimento bacteriano deverá ser avaliado com bastante precaução. Em alguns casos podem ser evidenciadas células leveduriformes e/ou hifas, indicando nesse caso a necessidade de semeadura do material em meio de cultura Saboraud para verificação do crescimento fúngico. A avalia-

ção microscópica pode dar uma informação prévia com importância clínica, pois a visualização de diplococos Gram-positivos pode estar associada à presença de *S. pneumoniae*, diplococos Gram-positivos à *M. catarrhalis*, cocobacilos Gram-negativos à *H. influenzae*, bacilos Gram-negativos à *Pseudomonas aeruginosa* e estruturas fúngicas à *Candida sp*. (células leveduriformes) ou *Aspergillus sp*. (fungos filamentosos). Deve-se evitar o uso de caldos de enriquecimento, por exemplo, tioglicolato, pois tais meios permitem a multiplicação da microbiota normal e podem confundir o microbiologista no momento da interpretação do crescimento.

Cabe salientar que as principais bactérias podem ter seu crescimento prejudicado devido à utilização de antimicrobianos por via oral e/ou pomadas ou cremes otológicos. Nesse caso, a visualização e descrição precisa da bacterioscopia podem ser fundamentais para uma tomada de decisão clínica adequada.

Após a coleta do material, o mesmo deve ser processado em, no máximo, duas horas. No impedimento da semeadura dentro desse prazo, recomenda-se o uso de meios de transporte que mantenham a viabilidade bacteriana. O material deve ser encaminhado ao laboratório em até 12 horas, a temperatura ambiente.

A semeadura deve ser realizada por esgotamento e os meios de cultura sugeridos são ágar sangue (AS) e chocolate (ACHO). A incubação deve ser realizada em atmosfera de microaerofilia (5% a 10% de CO_2). Alguns laboratórios utilizam, também, o MacConkey (MC). O AS é importante para o crescimento de *S. pneumoniae* e *M. catarrhalis*, sendo o padrão de hemólise uma característica preliminar fundamental para caracterização do crescimento bacteriano.

Interpretação dos resultados

A bacterioscopia pode ser relatada independentemente se solicitada ou não. Deve-se reportar os microrganismos de acordo com a morfologia e propriedades tintoriais de forma quali e quantitativa. Pode-se colocar no laudo as formas visualizadas e associar com morfologias características de determinadas bactérias, como diplococos Gram-positivos sugestivos de *S. pneumoniae*, ou cocos Gram-positivos isolados, aos pares, e em tétrades sugestivos de estafilococos. A Tabela 35.1 mostra uma sugestão para descrição semiquantitativa do Gram. A presença de leucócitos e células epiteliais também deve ser reportada no laudo.

Nos casos em que há intensa resposta inflamatória, sem visualização compatível de bactérias, pode-se suspeitar de infecção por micobactéria, sendo imprescindível realizar a coloração de Ziehl-Neelsen. Quando visualizados bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) deve-se indicar a cultura para micobactérias a fim de identificar a espécie envolvida.

A. otitis é um coco Gram-positivo, de crescimento lento (cinco dias) em AS. Apresenta colônia puntiforme, úmida, levemente amarelada e α-hemolítica. Para caracterização bioquímica pode-se utilizar as provas de catalase (negativa ou fracamente positiva), PYR e MTS positivos.

Sugere-se reportar o crescimento bacteriano de forma semiquantitativa (raras/poucas/muitas/numerosas/colônias). No caso de bactérias potencialmente patogênicas, recomenda-se realizar o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. Se forem isoladas bactérias pertencentes à microbiota normal, basta citar, sem necessidade de antibiograma, podendo sugerir uma provável contaminação. Quando não há crescimento bacteriano e/ou o laboratório opte por não descrever micro-organismos da microbiota, recomenda-se descrever apenas como "Ausência de crescimento de microrganismos patogênicos na amostra".

Sinusites

Introdução

A sinusite é caracterizada por qualquer obstrução dos seios paranasais, levando a um processo inflamatório. Tal processo nem sempre é de origem infecciosa, visto que em muitos casos a origem é alérgica. Os sintomas muitas vezes são inespecíficos, sendo que o diagnóstico é fundamentado numa anamnese precisa e em exame clínico adequado. Geralmente a utilização de exames radiográficos é indicada, servindo para comprovar o processo inflamatório local, porém com pouco impacto na investigação etiológica do evento.

Agentes etiológicos

Os seios paranasais são normalmente estéreis, mas as bactérias que colonizam o trato respiratório superior podem atingi-los por fatores ainda não bem conhecidos. Sendo assim, quando de origem bacteriana, as sinusites são causadas por *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* e *S. aureus*. Outras bactérias podem, de forma mais infrequente, estar associadas com anaeróbios (principalmente de origem da microbiota oral), *M.*

Tabela 35.1 Sugestão para descrição semiquantitativa de bacterioscopias de amostras clínicas coradas pelo Gram.

Células – PMNs média em 10 campos (objetiva 10×)				Bactérias e leveduras interpretação – Gram (objetiva 100×)			
0	+	++	+++	+	++	+++	++++
Neg	Raro	Pouco	Muito	Raras	Poucas	Muitas	Numerosas
0	1-9	10-25	> 25	< 1	1-5	6-30	> 30

Fonte: Adaptada de Isenberg, 2007.

pneumoniae e *C. pneumoniae*. Podem, também, ser causadas por fungos, como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Candida*, *Fusarium*, o que geralmente ocorre em pacientes neutropênicos. Dessa forma, é imprescindível que o clínico coloque na prescrição a suspeita de tais agentes, pois a maioria dos laboratórios não realiza cultura para anaeróbios e o cultivo de fungos necessita de meios especiais e incubação prolongada para detecção do crescimento.

Processamento

Devido ao seu caráter invasivo, a cultura direta obtida através de aspiração dos seios maxilares somente é recomendada nos casos de falha no tratamento com fármacos de primeira e segunda escolha, segundo a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA). Não é recomendada cultura de nasofaringe, tampouco aspiração do material inflamatório via fossas nasais. Como a maioria dos laboratórios de microbiologia clínica não realiza cultura para anaeróbios, a coloração de Gram pode ser decisiva para caracterização de uma infecção por esses agentes.

O material clínico, obtido pelo médico responsável, deve ser semeado imediatamente em meio de AS e ACHO ou, no caso de impedimento de semeadura no momento da coleta, utilizado meio de transporte, devendo ser encaminhado ao laboratório em até 12 horas. A incubação deve ser em microaerofilia por 48 horas. Excetuando-se as bactérias anaeróbias e os fungos, os agentes usualmente relacionados com sinusite crescem em AS (menos *H. influenzae*) e são de fácil caracterização bioquímica.

Interpretação dos resultados

Por tratar-se de uma amostra de boa qualidade, colhida de forma asséptica, todo o crescimento bacteriano deve ser considerado como potencialmente patogênico e reportado no resultado.

Faringites

Introdução

As faringites agudas estão entre as causas mais comuns de consultas médicas. Geralmente são causadas por vírus (rinovírus, coronavírus, adenovírus), sendo caracterizadas por um processo inflamatório difuso ou localizado, hiperemia, dificuldade de deglutição, dor e febre. A história clínica do paciente pode auxiliar na diferenciação de um processo viral ou bacteriano. Quadros com início súbito, com febre > 38 ºC, com exsudato purulento, adenopatia cervical, em crianças de 3 a 14 anos, sugerem etiologia bacteriana (mais comumente associado com *S. pyogenes*) e requerem tratamento antimicrobiano adequado.

Um dos principais problemas associados a um quadro de faringite estreptocócica é a possibilidade de desenvolvimento de um processo inflamatório tardio, de origem autoimune, no qual uma parte da população geneticamente predisposta (os índices podem variar de 0,5% a 3%) inicia um quadro de hipersensibilidade do tipo III, caracterizada pela deposição de imunocomplexos em tecidos específicos, cardíaco, renal e muscular, originando um processo inflamatório lento, crônico, degenerativo e silencioso, cujo diagnóstico deve ser realizado pela dosagem de antiestreptolisina (ASO).

Agentes patogênicos

Estima-se que pelo menos 80% das faringites sejam causadas por vírus. Apesar de mais incomuns, as faringites bacterianas produzem quadros clínicos com sintomatologia mais exacerbada e podem promover aumento de morbidade em tais processos. As bactérias mais comumente associadas com as faringites agudas são os estreptococos β-hemolíticos, pertencentes aos grupos A, C e G de Lancefield. Entre os microrganismos menos frequentes podemos citar *Neisseria gonorrhoeae*, *Corynebacterium diphteriae*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Treponema pallidum* e *C. pneumoniae*.

Processamento

As amostras devem ser semeadas em meio de AS e ACHO (ágar Thayer Martin em suspeita de faringite gonocócica). A incubação deve ser realizada a 35 ºC, por até 72 horas, em atmosfera de microaerofilia.

Interpretação dos resultados

Rotineiramente são pesquisados em material de orofaringe os estreptococos β-hemolíticos. Os que estão associados com faringite estreptocócica são os estreptococos dos grupos A, C e G. Podemos diferenciá-los através das características mostradas na Tabela 35.2.

Tabela 35.2 Características presuntivas de estreptococos β-hemolíticos associados com faringite.

Espécie	Lancefield	Bacitracina	PYR	Sorbitol	Trealose
S. *pyogenes*	A	Sensível	+	-	I
S. dysgalactiae subsp. *equisimilis*	C	Resistente	-	-	+
S. dysgalactiae subsp. *equisimilis*	G	Resistente	-	-	+
S. dysgalactiae subsp. *zooepidemicus*	C	Resistente	-	+	-

Fonte: Adaptada de Diez *et al.*, 2007. Nota: I - indeterminado.

Cabe salientar que nem todos os laboratórios dispõem das provas supracitadas. Nesse caso, a realização da prova da bacitracina e/ou PYR podem auxiliar no diagnóstico de *S. pyogenes*. No caso de suscetibilidade à bacitracina e/ou PYR negativo pode ser reportado como estreptococo β-hemolítico do grupo C ou G, pois dessa forma excluímos o *S. pyogenes,* que apresenta maior virulência e a possibilidade de manifestações tardias sistêmicas (febre reumática). No caso de ausência de crescimento, pode ser reportado como "Ausência de crescimento de estreptococos β-hemolíticos dos grupos A, C ou G". Alguns pacientes com histórico de uso de antimicrobianos, principalmente betalactâmicos, podem apresentar modificação de microbiota e, dessa forma, produzir crescimento congruente de bactérias Gram-negativas, como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, que devem ser identificadas e reportadas, com realização de antibiograma a critério do clínico.

Atualmente estão disponíveis vários testes rápidos para detecção de *S. pyogenes* em amostras de faringe. Tais testes detectam o antígeno A da parede celular da bactéria. O material utilizado é o raspado de orofaringe, tratando-se de um procedimento simples, rápido e de fácil leitura. Utiliza metodologia de imunocromatografia, aglutinação ou imunoensaio. Pode ser uma alternativa à cultura, visto que o resultado está disponível em 15 minutos e não é limitado pelo uso prévio de antimicrobianos. Porém, sempre é recomendado que seja confirmado com testes culturais, pois as apresentações comerciais podem apresentar baixas sensibilidades, originando resultados falso-negativos.

Neisseria gonorrhoeae é um diplococo Gram-negativo causador de faringite gonocócica. Dadas as consequências sociais e legais de sua descrição, deve ser sempre confirmada através de cultivo, com identificação em nível de espécie, pois a microbiota normal da faringe pode ser composta de espécies de *Neisseria* não patogênicas.

A presença de bacilos Gram-positivos pleomórficos, em forma de "letras chinesas", associado à presença de placas pseudomembranosas, pode ser indicativo de difteria. Nesse caso, deve-se realizar a coloração de Albert-Laybourn, visualizando bacilos com granulações metacromáticas. Cabe salientar que a microscopia direta pode fornecer resultados falso-positivos, sendo indicada a cultura do microrganismo para correta caracterização do mesmo, visto que a difteria atualmente é uma doença extremamente rara em nosso país.

Dentre os microrganismos causadores de faringite incomum temos *Arcanobacterium haemolyticum*. O diagnóstico é dificultado pelo crescimento lento desse microrganismo, devendo manter as placas incubadas por 72 horas.

Eventualmente, precisamos lançar mão de testes sorológicos para confirmação de infecções causadas por bactérias que não crescem ou dificilmente podem ser cultivadas. Nesse grupo podemos incluir *Treponema pallidum*, cujo diagnóstico pode ser facilmente realizado por testes de triagem como o VDRL, confirmado com FTA-ABS.

Os micoplasmas, que não apresentam parede celular, requerem meios especiais para crescimento, enriquecidos e acrescidos de antimicrobianos para dificultar o crescimento de outros microrganismos. *M. pneumoniae* não é facilmente recuperado de amostras clínicas, sendo utilizado para seu diagnóstico testes de ELISA IgG e IgM, que apresentam sensibilidade e especificidade variáveis, causando muitas vezes grande dificuldade para interpretação dos resultados.

Exemplo semelhante pode ser atribuído à *C. pneumoniae,* que não é visualizada pelo Gram e não cultivável. A metodologia utilizada para sua detecção é a imunofluorescência, um método trabalhoso, de difícil padronização, qualitativo, e de leitura subjetiva.

Para diagnóstico da angina de Vincent utiliza-se apenas a microscopia corada pelo Gram. A visualização de bactérias espiraladas (espiroquetas) associadas a bactérias fusiformes é sugestivo, podendo ser reportada como: "Presença de bacilos fusiformes e espirilares compatíveis com associação fusoespirilar, sugestivo de angina de Vincent".

INFECÇÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO INFERIOR

Introdução

As infecções de trato respiratório inferior (ITRI) estão entre as principais doenças infecciosas no mundo. No Brasil, embora os dados não sejam muito precisos, as ITRI constituem a quinta causa de óbitos. Mudanças nas características da população, tais como aumento da expectativa de vida e maior número de pacientes com imunossupressão justificam o aumento observado na incidência dessas doenças nos últimos anos.

Essas infecções podem variar em gravidade, desde bronquite aguda até pneumonias severas e potencialmente fatais. As bronquites agudas são normalmente associadas a vírus (em torno de 90% dos casos), destacando-se o vírus *Influenza* e o vírus respiratório sincicial. Entre as causas não virais de bronquite aguda, as principais são *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis*. Já as formas crônicas das bronquites são menos correlacionadas com microrganismos: geralmente estão relacionadas ao fumo ou à poluição. Entretanto, a exacerbação da bronquite crônica, que ocorre mais comumente em pacientes com doença de base (por exemplo, doença pulmonar obstrutiva crônica), tem relação com microrganismos, sendo os mais frequentes *H. influenzae* e *S. pneumoniae*, além dos agentes virais.

Mais graves que as bronquites, as pneumonias são principalmente bacterianas e podem ser adquiridas na comunidade (CAP, do inglês: *Community-acquired pneumonia*) ou associadas à assistência à saúde. As CAPs são um grave problema de saúde pública mundial, especialmente nos países em desenvolvimento, e em faixas etárias específicas: crianças abaixo dos cinco anos e idosos acima dos 65 anos de idade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, nos países em desenvolvimento, aproximadamente 5 milhões de crianças abaixo dos cinco anos de idade morram anualmente em decorrência de pneumonias comunitárias. No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde (MS), no período de 2000

a 2008 houve média de 4.200.000 internações por ano, decorrentes de pneumonias. Os principais agentes etiológicos associados são: *S. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *H. influenzae* e *Legionella* spp. Também são relevantes *S. aureus*, e alguns bacilos Gram-negativos aeróbios. Além disso, *M. catarrhalis* pode ser agente causal de CAP, muito embora seu papel real como patógeno do trato respiratório inferior possa ser controverso.

A pneumonia nosocomial (que é, por definição, caracterizada 48 horas após internação hospitalar), é considerada a infecção associada à assistência à saúde (IAAS) mais frequente, especialmente entre pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Nessas pneumonias, os agentes etiológicos mais comuns são: *S. aureus*, enterobactérias (em particular, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter* spp.) e bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose, tais como: *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Nas UTIs, aproximadamente 80% dos casos de pneumonia estão associados à ventilação mecânica (PAV – Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica), o que configura o uso de ventiladores artificiais como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de pneumonia nesses ambientes. Isso ocorre porque os pacientes entubados apresentam deficiências em alguns importantes mecanismos fisiológicos inespecíficos de defesa, como o reflexo da tosse, tornando-os altamente colonizados por potenciais patógenos.

O empiema pleural (acúmulo de secreção purulenta na cavidade pleural) é, em geral, uma complicação da pneumonia bacteriana, seja ela comunitária ou nosocomial. Pacientes com empiema são consideravelmente mais graves e têm abordagem clínica diferenciada, já que necessitam, muitas vezes, da drenagem cirúrgica desse excesso de líquido e secreção (toracocentese). *S. aureus* e *S. pneumoniae* estão particularmente associados a pneumonias acompanhadas de derrame pleural e empiema. Menos frequentemente, outros microrganismos também podem causar essa complicação.

Uma condição clínica que merece atenção especial é a fibrose cística. Pacientes com essa doença genética apresentam, além de outras características, secreção brônquica muito viscosa, podendo levar à estase pulmonar, situação que os torna consideravelmente mais suscetíveis à colonização e/ou infecção nesse sítio anatômico. Devido a isso, esses pacientes são submetidos rotineiramente à cultura de materiais de trato respiratório inferior. Microrganismos especialmente importantes nesses pacientes incluem *S. aureus*, *H. influenzae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, complexo *Burkholderia cepacia*, além de *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* e outros bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose.

Independentemente do tipo de ITRI, o diagnóstico microbiológico é desafiador. Nos casos de bronquite aguda, o diagnóstico laboratorial é fortemente desencorajado por resultados de meta-análises. Talvez, a exceção a isso seja o diagnóstico da coqueluche (causada por *B. pertussis*). Uma vez que a coqueluche é mais grave e pode apresentar sintomas clínicos não específicos em relação às bronquites em geral, o diagnóstico microbiológico reveste-se de particular importância em pacientes que apresentam tosse crônica em uma região epidemiológica apropriada. Nesses casos, a cultura direcionada para pesquisa de *B. pertussis* e os testes imunológicos específicos são altamente recomendados.

Em relação à CAP, dois são os pontos principais responsáveis pelas controvérsias no diagnóstico microbiológico: o primeiro deles é o uso frequente de antimicrobianos previamente à coleta do espécime, comprometendo consideravelmente a sensibilidade (resultados falso-negativos) da cultura. O segundo é a frequente contaminação do espécime com material do trato respiratório superior, implicando na diminuição da especificidade (resultados falso-positivos) da cultura. Apesar desses dois fatores bastante relevantes, o diagnóstico etiológico preciso e a determinação do perfil de suscetibilidade (necessário na ocorrência de falha terapêutica, para ajuste de tratamento ou para fins epidemiológicos) são primariamente definidos a partir da cultura, a qual continua sendo considerada padrão-ouro para o diagnóstico da CAP.

Somados ao uso prévio de antimicrobianos, outros fatores justificam a falta de sensibilidade das culturas no diagnóstico da CAP. A contaminação com material do trato respiratório superior, além de interferir na especificidade, pode inibir o crescimento do microrganismo patogênico, tornando a cultura menos sensível. Além disso, patógenos associados às pneumonias atípicas são difíceis de crescer e exigem meios de cultura específicos. Em casos de suspeita clínica de pneumonia atípica (*C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* e *Legionella* spp.), o laboratório de microbiologia deve ser informado, para que meios de cultura adequados possam ser utilizados.

Menos controverso é, no entanto, o diagnóstico microbiológico das pneumonias associadas à assistência à saúde. O desafio aqui está no fato de os pacientes em ventilação mecânica serem altamente colonizados com possíveis patógenos. Esse fato compromete a especificidade dos resultados da cultura. Nesse sentido, *guidelines* das principais sociedades de pneumologia mundiais determinam condutas baseadas em evidências clínicas para o diagnóstico da pneumonia associada à ventilação mecânica. Entretanto, segundo eles, a falta de especificidade dos achados clínicos e a baixa reprodutividade do raio X de tórax exigem o desenvolvimento de procedimentos adicionais, tais como a cultura de espécimes do trato respiratório inferior. Cabe ressaltar, aqui, que manifestações clínicas são especialmente inespecíficas em pacientes altamente debilitados e idosos, reiterando a necessidade do diagnóstico microbiológico. Na tentativa de aumentar a especificidade da cultura qualitativa de rotina, uma ferramenta microbiológica importante é a cultura quantitativa.

A tuberculose é um grave problema de saúde pública mundial, especialmente em países em desenvolvimento, como o Brasil. Não é intenção deste capítulo discutir questões laboratoriais relacionadas ao diagnóstico microbiológico da tuberculose. Para isso, sugere-se consultar referências específicas.

A menos que um grande cuidado seja tomado na coleta do espécime, o diagnóstico das ITRI é frequentemente complicado por haver contaminação com material do trato respiratório superior, o qual pode ser colonizado com pató-

genos potenciais, mas que não estão envolvidos na infecção em questão. A consequência disso é o comprometimento da especificidade do resultado microbiológico, e uma indução do uso inadequado e desnecessário de antimicrobianos.

Para a realização da cultura, basicamente dois tipos de materiais podem ser enviados ao laboratório: secreções não invasivas (escarro expectorado e induzido), e as invasivas, que incluem aspirado traqueal, lavado brônquico, escovado brônquico, lavado broncoalveolar, e biópsia de tecido. Pela menor probabilidade de contaminação com material do trato respiratório superior, as secreções invasivas são preferidas para a realização da cultura. Por outro lado, pela facilidade de coleta, o escarro é, sem dúvida, o espécime clínico mais frequentemente recebido nos laboratórios para o diagnóstico de ITRI.

Outros possíveis espécimes clínicos associados à ITRI são: *swab* de orofaringe e líquido pleural. É importante lembrar que pacientes com fibrose cística podem apresentar considerável dificuldade de expectoração. Por essa condição clínica, e excepcionalmente nesses casos, *swabs* de orofaringe podem ser aceitos pelo laboratório para a realização da cultura. Ressalte-se que, em qualquer outra situação, *swabs* de orofaringe não são adequados e devem ser rejeitados para o diagnóstico de infecções pulmonares.

Processamento

Um atraso no processamento do escarro de mais de duas horas e dos espécimes coletados por broncoscopia de mais de uma a duas horas pode resultar em diminuição considerável da capacidade de recuperação de microrganismos fastidiosos, tais como: *H. influenzae* e *S. pneumoniae*. Também, pode haver crescimento exacerbado de microbiota do trato respiratório superior, podendo levar a resultados com baixa especificidade, ou seja, valorização de microrganismos não associados ao processo infeccioso em questão e consequentes tratamentos inadequados.

É de consenso geral que a cultura de espécimes respiratórios de má qualidade gasta tempo e dinheiro dos laboratórios de microbiologia, sem gerar resultados impactantes na prática clínica, podendo levar à indução de tratamentos desnecessários. A partir do esfregaço corado pelo método de Gram, a análise microscópica detalhada do espécime deve ser realizada. O parâmetro mais aceito para a análise da qualidade microscópica é o que leva em consideração o número de células epiteliais e de leucócitos polimorfonucleares (PMN). Caso a amostra apresente mais de dez células epiteliais por campo (10×) e menos de 25 PMN por campo (10×), essa deve ser considerada amostra inadequada, pois possivelmente represente um espécime contaminado com material do trato respiratório superior. Deve-se observar de 20 a 40 campos e fazer a média da contagem para que o resultado seja fidedigno.

Pacientes severamente neutropênicos, transplantados de medula óssea ou imunodeprimidos podem apresentar uma amostra adequada e representativa sem que essa tenha o número exigido de PMN na avaliação de qualidade. Esses casos devem ser avaliados cuidadosa e individualmente, e o microbiologista deve ser informado dessa condição do paciente. A presença de células epiteliais ciliadas pode auxiliar nessa avaliação, já que essas são células características de trato respiratório inferior. Escarro e aspirado traqueal destinados à pesquisa de *Legionella* spp. ou bacilos álcool-ácido resistentes não devem ser submetidos à avaliação da amostra, por serem microrganismos associados a respostas imunológicas peculiares. Espécimes de pacientes com fibrose cística também não devem ser submetidos à avaliação da qualidade da amostra.

Em casos de amostras inadequadas, uma nova coleta deve ser solicitada, o mais brevemente possível. Amostras duplicadas de um mesmo paciente em 24 horas somente deverão ser aceitas se a primeira tiver sido rejeitada.

O resultado da bacterioscopia é muito importante para a equipe médica, especialmente por causa da rapidez com que o resultado pode ser liberado. Tão mais adequado será o resultado quanto melhor for a qualidade do espécime clínico e a capacidade técnica do microbiologista. A informação oferecida pela bacterioscopia pode guiar a terapia inicial e indicar qual o provável patógeno. Para isso, o resultado deve ser liberado de forma clara, incluindo a celularidade e os principais morfotipos bacterianos presentes. A presença de bactérias intracelulares indica infecção ativa. Essa informação aumenta a especificidade do resultado, garantindo que o microrganismo em questão é o responsável pelo processo infeccioso, já que está sendo ativamente fagocitado pelos PMN.

O segundo passo no processamento do espécime é a cultura. Tipicamente, as porções mais purulentas e/ou sanguinolentas (sangue no escarro ou hemoptise geralmente indicam dano grave no tecido pulmonar) dos materiais coletados de trato respiratório inferior são semeadas, por esgotamento, em AS, ACHO e MC. As placas devem ser incubadas (35 °C a 37 °C, em microaerofilia) por, no mínimo, 48 horas. Em 24 horas as placas devem ser inspecionadas. É importante lembrar que o resultado da bacterioscopia deve ser utilizado como guia na interpretação da cultura. Uma nova inspeção das placas em 24 ou 48 horas adicionais é útil para detectar bacilos Gram-negativos fastidiosos e com crescimento lento, tais como: *Bordetella* sp., ou fungos filamentosos, como *Aspergillus* sp.

Em culturas qualitativas devem ser reportados como prováveis patógenos microrganismos que apresentarem: 1) crescimento intenso no segundo ou no maior quadrante da placa de cultura; 2) pequena quantidade de crescimento, mas que seja condizente com o morfotipo predominante no bacterioscópico; ou 3) crescimento puro (ou quase) no primeiro quadrante.

Em se tratando de espécimes que podem facilmente ser contaminados com microbiota do trato respiratório superior, a quantificação do crescimento bacteriano é uma tentativa de aumentar a especificidade dos resultados obtidos, reduzindo, assim, o uso desnecessário de antimicrobianos. Para a cultura quantitativa de escarro e aspirado traqueal, é utilizado o método da diluição seriada (Figura 35.1). As placas e as condições de incubação são as mesmas descritas para culturas qualitativas. A interpretação e os pontos de corte serão discutidos na sessão "Como interpretar e reportar resultados".

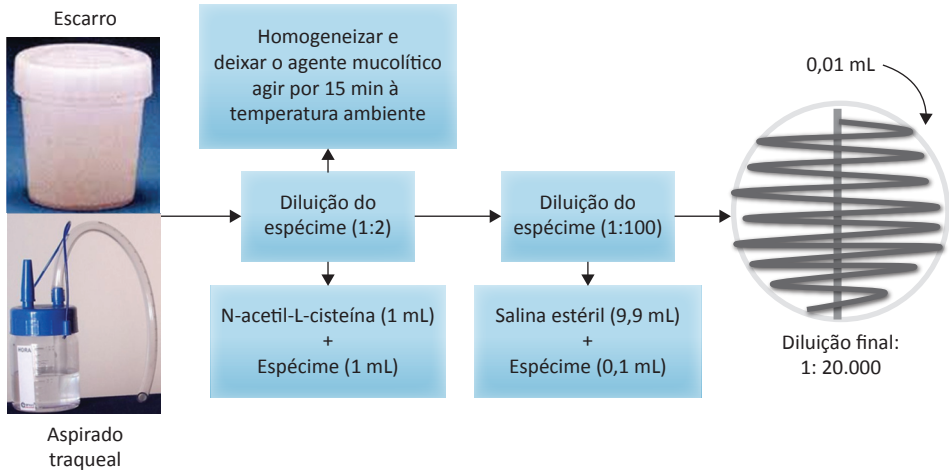


Figura 35.1 Representação esquemática do processamento do escarro e aspirado traqueal para realização de cultura quantitativa pelo método da diluição seriada.
Fonte: Adaptada de Oplustil *et al.*, 2010.

Por sua vez, a cultura de lavado brônquico, lavado broncoalveolar e escovado brônquico pode ser realizada pelo método da diluição seriada (Figura 35.2) ou pelo método da alça calibrada (Figura 35.3). As placas e as condições de incubação são as mesmas descritas para culturas qualitativas. A interpretação e os pontos de corte serão discutidos na sessão "Como interpretar e reportar resultados".

Para espécimes provenientes de pacientes com fibrose cística, recomenda-se que, além dos meios de cultura convencionais, sejam também utilizados meios mais seletivos como o ágar CNA (seletivo para cocos Gram-positivos, como *S. aureus*) e BCSA (*Burkholderia cepacia* selective agar). As culturas aqui podem ser qualitativas ou quantitativas e a incubação das placas deve seguir o padrão, à exceção do ágar BCSA, que deve ser incubado por cinco dias.

Além da cultura, outros testes podem auxiliar especificamente o diagnóstico da CAP. Um deles é a detecção de antígenos de *Legionella* spp. ou *S. pneumoniae* na urina. As principais vantagens desses testes incluem a rapidez na obtenção dos resultados (cerca de 20 minutos) e a não influência da antibioticoterapia prévia. Trabalhos demonstram que esses testes têm boa sensibilidade e especificidade. Exceção deve ser pontuada no caso de crianças abaixo de cinco anos de idade com doença pneumocócica, onde a especificidade do teste é consideravelmente baixa, devido ao fato de essas crianças serem altamente colonizadas na nasofaringe por *S. pneumoniae*. Por sua vez, os testes sorológicos são importantes para patógenos atípicos (*M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* e *Legionella* spp.). A contribuição desses patógenos na epidemiologia da CAP depende da população estudada e o método diagnóstico utilizado.

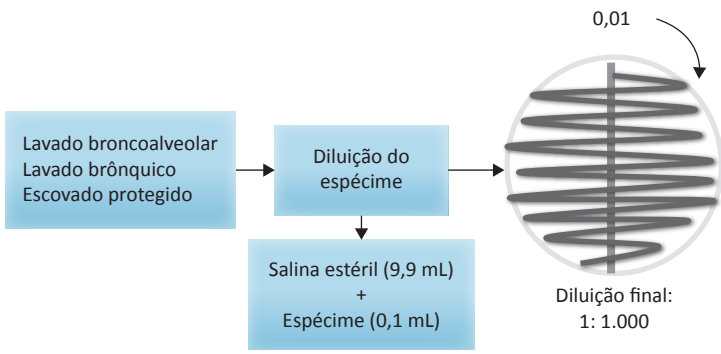


Figura 35.2 Representação esquemática do processamento do lavado broncoalveolar, lavado brônquico ou escovado protegido para realização de cultura quantitativa pelo método da diluição seriada.
Fonte: Adaptada de Oplustil *et al.*, 2010.

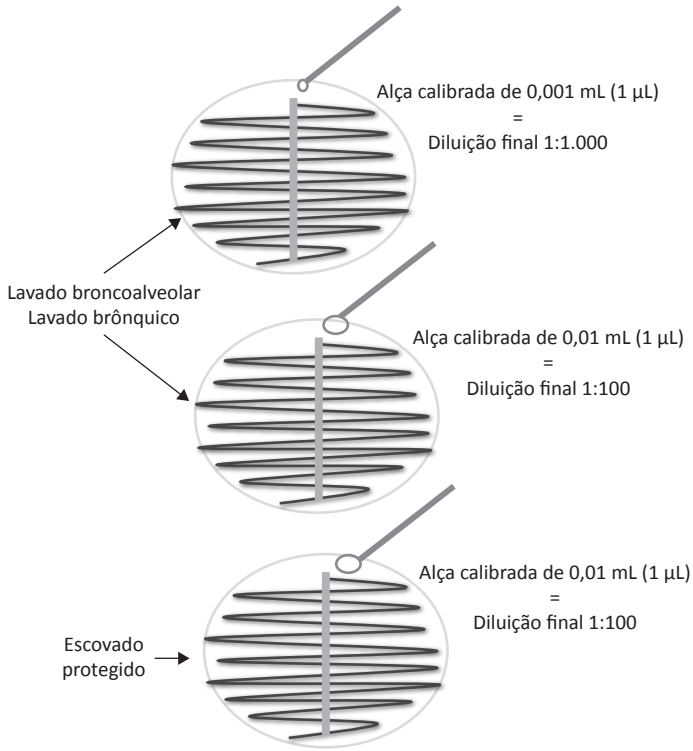


Figura 35.3 Representação esquemática do processamento do lavado broncoalveolar, lavado brônquico ou escovado protegido para realização de cultura quantitativa pelo método da alça calibrada.
Fonte: Adaptada de Oplustil *et al.*, 2010.

Como interpretar e relatar resultados

É de extrema importância que o microbiologista seja crítico no momento de interpretar e reportar resultados de cultura de espécimes potencialmente contaminados com microrganismos colonizantes, como é o caso das secreções de trato respiratório inferior. Nesse sentido, deve-se saber que, mesmo podendo ser agente etiológico de pneumonias, não raras vezes, os microrganismos podem ser apenas parte da microbiota. Em pacientes altamente colonizados, como aqueles submetidos à ventilação mecânica, as culturas quantitativas devem ser fortemente encorajadas, já que são uma ferramenta microbiológica muito importante na difícil interpretação da participação ou não de um microrganismo no processo infeccioso.

Na bacterioscopia, o microbiologista deve, baseado em um conhecimento técnico robusto, liberar os resultados mais específicos possíveis. Imaginemos, por exemplo, a seguinte situação: o microbiologista observa o esfregaço corado pelo método de Gram de um paciente não internado. Ele visualiza diplococos Gram-positivos. Pela sua experiência, ao visualizar os diplococos, percebe que são lanceolados e capsulados, e suspeita fortemente que se trate de *S. pneumoniae*. Caso ele opte por liberar o laudo da forma descrita (diplococos Gram-positivos), não estará tecnicamente incorreto. Entretanto, um laudo em que conste "diplococos Gram-positivos lanceolados, sugestivos de *S. pneumoniae*" é muito mais informativo e induz a uma terapia mais adequada.

Deve ser também fortemente estimulada a liberação dos resultados de bacterioscopia tão logo esses resultados estejam disponíveis, de preferência, por sistema computadorizado. Nesse sentido, seguem exemplos de laudos de bacterioscópico. Note-se a importância de informar a observação de bactérias intracelulares.

Exemplo 1

Espécime clínico: escarro

Bacterioscopia:

Células epiteliais: < 10/campo (40×)

- Leucócitos polimorfonucleares: > 25/campo (40×)
- Numerosos diplococos Gram-positivos lanceolados sugestivos de S. *pneumoniae*

Cultura: em andamento

Obs.: Presença de microrganismos intracelulares, indicando fagocitose ativa.

Exemplo 2

Espécime clínico: lavado broncoalveolar

Bacterioscopia:

Células epiteliais: < 10/campo (40×)

- Leucócitos polimorfonucleares: > 25/campo (40×)
- Raros cocobacilos Gram-negativos
- Alguns cocos Gram-positivos aos pares
- Sugere-se microbiota normal

Cultura: em andamento

Exemplo 3

Espécime clínico: aspirado traqueal

Bacterioscopia: Presença de mais de 10 células epiteliais por campo (40×) e menos de 25 leucócitos polimorfonucleares por campo (40×) indicando contaminação com material do trato respiratório superior. Nova coleta é indicada, a critério médico.

Cultura: espécime inadequado para a realização da cultura. Para informações adicionais, favor contatar o setor de Microbiologia.

Os pontos de corte para as culturas quantitativas de escovado brônquico (cateter protegido), lavado broncoalveolar e aspirado traqueal são, respectivamente, 10^3, 10^4 e 10^6 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia por mililitro) e os laudos dessas culturas devem enaltecer tais valores. Já que aspirado traqueal é o espécime mais sujeito a resultados falso-positivos, é compreensível que seu ponto de corte seja mais elevado. Mesmo assim, esse ponto de corte garante especificidade de aproximadamente 80%.

A Tabela 35.3 traz a interpretação do crescimento bacteriano, correlacionando o número de colônias observado nas placas de cultura com a quantidade de UFC/mL correspondente, de acordo com o fator de diluição ou o volume semeado.

Então, de acordo com a Tabela 35.3, e respeitando os pontos de corte definidos para cada cultura quantitativa, consideremos o seguinte exemplo: um aspirado traqueal é processado de forma quantitativa e, após 24 horas, são observadas 70 colônias de *P. aeruginosa* (situação A). Em outra situação, um lavado broncoalveolar é processado quantitativamente utilizando-se uma alça bacteriológica de 10 μL e são observadas, também, 70 colônias de *P. aeuruginosa* (situação B). Na situação A, a cultura quantitativa é positiva (acima do ponto de corte), já que seriam necessárias 50 colônias ($50 \times 20.000 = 10^6$) para que o ponto de corte de 10^6 UFC/mL fosse atingido. Por outro lado, na situação B, o fator de diluição é menor (100), sendo necessárias pelo menos 100 colônias para corresponder a um valor igual ou superior ao ponto de corte (10^4 UFC/mL). Nesse caso, a cultura quantitativa é negativa (crescimento abaixo do ponto de corte).

A critério do microbiologista fica a decisão de liberar apenas o(s) microrganismo(s) com contagem superior ao ponto de corte (exemplo 4) ou todos os microrganismos (exemplo 5) observados na cultura, ressaltando-se que, para uma equipe médica inexperiente, o exemplo 5 pode induzir, desnecessariamente, o uso de antimicrobianos.

Exemplo 4

Espécime clínico: lavado broncoalveolar

Bacterioscopia: Células epiteliais: < 10/campo (40×)

Leucócitos polimorfonucleares: > 25/campo (40×)

- Numerosos bacilos Gram-negativos
- Raros cocos Gram-positivos aos pares

Cultura: Acinetobacter baumannii > 10^4 UFC/mL

Obs.: O ponto de corte utilizado para culturas quantitativas de lavado broncoalveolar é 10^4 UFC/mL

Exemplo 5

Espécime clínico: lavado broncoalveolar

Bacterioscopia: Células epiteliais: <10/campo (40×)

- Leucócitos polimorfonucleares: > 25/campo (40×)
- Numerosos bacilos Gram-negativos
- Raros cocos Gram-positivos aos pares

Cultura: *Acinetobacter baumannii* > 10^4 UFC/mL
Staphylococcus aureus 10^2 UFC/mL

Obs.: O ponto de corte utilizado pelo laboratório para culturas quantitativas de lavado broncoalveolar é 10^4 UFC/mL.

Tabela 35.3 Interpretação das culturas quantitativas, considerando a quantidade de colônias que cresceram no meio de cultura.

Material	Diluição ou volume da alça bacteriológica	Equivalente em UFC/mL de uma colônia
Lavado broncoalveolar, lavado brônquico ou escovado protegido	Diluição 1:1.000	$1.000 = 10^3$
	Alça calibrada de 0,01 mL	$100 = 10^2$
	Alça calibrada de 0,001 mL	$1.000 = 10^3$
Escarro ou aspirado traqueal	Diluição 1:20.000	$20.000 = 2 \times 10^4$

Fonte: Adaptada de Oplustil.[7]

Cepas de *P. aeruginosa* podem produzir alginato, que é um polímero polissacarídico, que forma uma matriz externa, leva ao crescimento bacteriano em biofilme, e gera um fenótipo mucoide. Esse fenômeno ocorre com maior frequência na mucosa respiratória de pacientes fibrocísticos, e indica, frequentemente, infecção crônica. Cepas de *P. aueruginosa* mucoides respondem consideravelmente menos aos tratamentos antimicrobianos, já que o alginato confere uma barreira física para que os mesmos possam atingir a célula bacteriana. Sendo assim, a ocorrência desse fenótipo tem implicação clínica e deve, portanto, ser reportado à equipe médica.

Quanto mais propriedade e domínio de conhecimento o microbiologista possuir, melhor e mais efetiva será a transmissão da informação dele (pelos laudos que emitir) para a equipe médica. Em última instância, o paciente é o grande favorecido nesse processo, já que terá diagnóstico mais preciso e acurado e, consequentemente, tratamentos mais adequados.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Carrol K, Reimer L. Microbiology and Laboratory Diagnosis of Upper Respiratory Tract Infections. Clin Infect Dis. 1996;23:442-8.
2. Chow AW, Benninger MS, Brook I, et al. IDSA Clinical Practice Guideline for Acute Bacterial Rhinosinusitis in Children and Adults. Clin Infect Dis. 2012;54(8):1041-5.
3. Diez O, Batista N, Bordes A, et al. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio superior. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007;25(6):387-93.
4. Garcia LS, Isenerg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2.ed. Washington: ASM Press, 2007.
5. Mitra A, Hannay D, Kapur A, et al. The natural history of acute upper respiratory tract infections in children. Prim Health Care Res Dev. 2011;12:329-34.
6. Niederman MS. The argument against using quantitative cultures in clinical trials and for the management of ventilator-associated pneumonia. Clin Infect Dis. 2010;51: S93-S99.
7. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, et al. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 3.ed. São Paulo: Sarvier Editora, 2010.
8. Reissig A, Mempel C, Schumacher U, et al. Microbiological diagnosis and antibiotic therapy in patients with community-acquired pneumonia and acute COPD exacerbation in daily clinical practice: comparison to current guidelines. Lung. 2013;191:239-46.
9. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Diretrizes brasileiras para pneumonia adquirida na comunidade em adultos imunocompetentes – 2009. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.jornaldepneumologia.com.br/PDF/2009_35_6_11_portugues.pdf
10. Versalovic J, Caroll KC, Funke G, et al. Manual of Clinical Microbiology. 10.ed. Washington: ASM Press, 2011.

Leandro Reus Rodrigues Perez ▪ Cícero Armídio Gomes Dias

Hemocultura e Cultura de Ponta de Cateter

ASPECTOS GERAIS

A disseminação de microrganismos através da corrente circulatória, processo este denominado bacteremia, representa um estado séptico com importante implicação clínica ao paciente. Em ambiente hospitalar, as bacteremias podem representar, de modo geral, o primeiro ou segundo quadro infeccioso de maior prevalência. Como diagnóstico de tal processo bacterêmico, dispomos da cultura de amostras de sangue ou hemoculturas, e as culturas de cateteres, sendo estas últimas realizadas sob condições especiais em que os pacientes fazem uso de tais dispositivos. Nesse contexto, o laboratório clínico tem papel extremamente importante, uma vez que uma hemocultura positiva para microrganismos patogênicos é um indicador altamente específico de infecção da corrente sanguínea, permitindo que a subsequente identificação do agente e o teste de suscetibilidade auxiliem na orientação da terapia antimicrobiana, com significativa redução nas taxas de morbimortalidade. Entretanto, para que o exame seja acurado, se faz necessária a realização de um controle eficiente para alguns parâmetros, tais como: a) indicação clínica para a coleta de hemoculturas; b) número de amostras a serem coletadas; c) volume de sangue; d) tipos de frascos de cultura de acordo com a atmosfera de incubação:

a) **Indicação clínica:** de forma geral, a coleta de sangue para a realização da cultura deve ser realizada antes do início da antibioticoterapia, e para aqueles que apresentam quadro clínico sugestivo de infecção (febre, hipotermia, leucocitose), e quadros mais graves e/ou especiais a que estejam submetidos os pacientes, principalmente neonatos e idosos.
b) **Número de amostras:** de acordo com dados da literatura referentes à taxa de positividade cumulativa e quadros sépticos comprovados, recomenda-se coletar, no mínimo, duas amostras por episódio séptico. Sugere-se que, com isto, mais de 95% dos eventos sépticos ocasionados por fungos ou bactérias sejam detectados com o isolamento do microrganismo. Adicionalmente, a coleta de maior número de amostras traria pouco benefício, aumentando os custos e o trabalho sem aumento significativo da positividade.
c) **Volume de sangue:** talvez esta seja uma das variáveis mais críticas do exame, no que se refere à taxa de positividade. Resguardando as observações que devem ser feitas com respeito ao tipo de paciente (adulto ou pediátrico), o volume recomendado deve manter a proporção de sangue/caldo de cultura de 1:5 a 1:10. Para adultos, coleta-se 5 a 10 mL de sangue por frasco em cada punção, totalizando um volume final de 20 mL. Para crianças, o volume ideal de sangue ainda não está bem-definido. Entretanto, estudos demonstram que há relação direta entre o volume de sangue obtido e a recuperação do microrganismo.
d) **Atmosfera de incubação:** é comum a coleta pareada de hemoculturas, compreendendo um frasco anaeróbio e um aeróbio. Embora a coleta para a pesquisa de microrganismos anaeróbios deva ser dirigida somente quando da suspeita clínica, os estudos mostram que coletas incluindo o frasco anaeróbio permitem o isolamento de espécies de *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, alguns *Streptococcus* e *Enterococcus* sem perda na capacidade de recuperação microbiológica. Todavia, não é incomum a coleta pareada ser representada por duas coletas para cultura aeróbia. Além disso, a grande maioria dos frascos aeróbios e anaeróbios obtidos comercialmente permite, também, a detecção do crescimento de leveduras e até algumas espécies de fungos filamentosos.

Atualmente, existem diferentes tipos de equipamentos comerciais que permitem a realização automatizada da cultura de sangue. Estes apresentam grande vantagem em relação às metodologias manuais, principalmente no que se refere

à rapidez dos resultados e à diminuição do trabalho técnico especializado. O contínuo monitoramento pelo aparelho pela leitura realizada em tempos preestabelecidos, o constante sistema de agitação, o sistema de carvão ou resina para inativação de antibióticos no material clínico, a possibilidade de recuperar dados tais como o tempo de positividade e a geração de relatórios de prevalência, além do menor risco de contaminação, uma vez que é realizada a manipulação/repique somente das amostras positivas, são argumentos para o estabelecimento da automação.

De modo geral, os protocolos recomendam a incubação durante cinco dias, quando da suspeita de microrganismos aeróbios e anaeróbios, ou de dez dias quando da suspeita de fungos ou germes nutricionalmente exigentes ou de crescimento lento e, ainda, em torno de cinquenta dias de incubação para frascos especiais para outros fungos e micobactérias.

Alguns laboratórios, ainda que pela rotina pequena de cultura de sangue, podem utilizar metodologias manuais com utilização de frascos comercias para microrganismos aeróbios e anaeróbios. Em geral, esses frascos compreendem meios de cultura em meio líquido, tais como: infusão de cérebro e coração (*brain-heart infusion*-BHI); caldo *tryptic soy agar* (TSB) ou, ainda, um meio de cultura bifásico, sendo uma fase líquida e outra sólida, permitindo a observação do crescimento microbiano sobre a superfície do ágar. Embora ainda seja uma alternativa, o método manual não é o mais indicado para a cultura de sangue, por apresentar menor sensibilidade quando comparado com métodos automatizados. Para inspeção ou pré-triagem dos frascos, é recomendado realizar subcultivos "às cegas" em meio sólido, de modo sequencial, após períodos de incubação com respectiva análise morfotintorial pela coloração do Gram. Um período de sete dias de incubação, realizando agitação periódica dos frascos, é fator importante para maior taxa na positividade do exame.

DETERMINAÇÃO DE INFECÇÃO RELACIONADA A CATETER

Cateteres intravenosos são notáveis fontes de bacteremia e fungemia, assim como complicações infecciosas no local da inserção. Para a determinação do cateter como fonte de infecção são utilizadas duas formas de análise: a) cultura da ponta de cateter (segundo técnica descrita por Maki e colaboradores); ou b) análise/crescimento microbiano em amostras de hemocultura coletadas de forma pareada, ou seja, via sangue periférico e via amostra de sangue coletada através do cateter.

a) O método descrito por Maki e colaboradores é o mais amplamente utilizado para caracterizar a relação entre colonização do cateter e infecção. O método refere-se a uma cultura semiquantitativa, em que o segmento distal do cateter é rolado, com auxílio de uma pinça estéril sobre a superfície de uma placa de ágar sangue. Após incubação, durante período *overnight* (18 a 24 horas) de incubação a 35 °C, é realizada a contagem de colônias, considerando-se o crescimento de ≥ 15 unidades formadoras de colônia (UFC) por placa como sugestivo de colonização do cateter. É recomendável fazer uma nova observação da placa após 48 a 72 horas. A grande desvantagem dessa técnica é que a mesma avalia somente a superfície externa, ou extra-lúmen, do cateter, não sendo capaz de detectar massa microbiana ou biofilme aderido na porção interna, ou intralúmen, do dispositivo. Mais recentemente, de modo a tornar mais sensível a detecção microbiana sobre a superfície (interna ou externa) do cateter como um todo, diversos estudos têm avaliado a utilização de vórtex ou, ainda, de sonicação, como adicionais ao tradicional *roll plate* estabelecido por Maki e colaboradores. Apesar de os resultados serem promissores, com aumento na taxa de recuperação de microrganismos em potencial, essas modificações ainda carecem de padronização, sendo que mais estudos devam ser realizados para mostrar o seu real valor diagnóstico. Vale destacar que uma cultura de ponta de cateter positiva só poderá ser valorizada na presença de uma amostra de sangue periférico positiva para o mesmo microrganismo.

b) A coleta de hemoculturas pareadas e simultaneamente obtidas, uma através do cateter e outra da veia periférica, representa um teste diagnóstico mais conservador, pois evita a retirada do dispositivo (cateter) para análise. A análise é realizada baseada no fato que, entre amostras de igual volume, coletadas de forma pareada cateter/sangue periférico, o tempo para detecção da positividade é inversamente proporcional ao inóculo microbiano inicial. Ou seja, se a diferença no tempo de positividade for maior que duas horas, mais precoce para o frasco coletado do cateter em relação ao da veia periférica, está relacionada a infecções originárias do cateter. Essa metodologia apresenta sensibilidade variável, a depender do tipo de cateter, do tempo de permanência e da presença de outros focos infecciosos a distância, mas apresenta alto valor preditivo negativo, principalmente para cateteres de longa permanência, o que pode evitar, em muitos casos, a retirada desnecessária dos dispositivos.

INTERPRETAÇÃO DE HEMOCULTURAS POSITIVAS

Alguns microrganismos têm alto valor preditivo positivo para bacteremia verdadeira, mesmo quando isolado em somente uma amostra, por exemplo: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e outras *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, outras espécies de bacilos Gram-negativos não fermentadores e *Brucella* spp.

Streptococcus viridans, *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. coagulase negativos (SCN) representam ser, de modo geral,

microrganismos menos prevalentes em termos de agentes causais de bacteremia verdadeira. Adicionalmente, alguns tipos de microrganismos estão mais frequentemente associados com contaminação, tais como: *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp. e *Propionibacterium acnes*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. O número de hemoculturas positivas em função do número total de amostras coletadas (punções em diferentes sítios) é uma ferramenta muito útil para interpretação do significado clínico, pois ao contrário dos casos de pacientes com bacteremias verdadeiras, os contaminantes geralmente crescem somente em uma amostra (quando duas ou mais são obtidas). Portanto, a coleta de uma amostra única deve ser desencorajada, já que um número substancial de bacteremias pode não ser detectado e impossibilita a discriminação de verdadeiros patógenos de potenciais contaminantes.
2. Em casos específicos, onde há necessidade de coleta por meio de dispositivos, tais como cateteres, esta deve ser sempre acompanhada de uma ou duas amostras de veia periférica para auxiliar na interpretação do resultado.
3. Para hemoculturas positivas, com germes potencialmente contaminantes, estas devem ser criteriosamente avaliadas, incluindo pacientes neonatos e lactentes, pela dificuldade de coleta em diferentes sítios anatômicos.
4. Alguns estudos mostram que mesmo uma única amostra positiva com SCN pode ser indicativa de infecção em determinadas situações (principalmente associadas a cateter intravascular).
5. Em pacientes de alto risco, encontrar mais de uma hemocultura positiva para bactérias, normalmente consideradas contaminantes como *Corynebacterium* spp. e *Bacillus* spp., pode ainda ter significado clínico.
6. Um importante exame a ser realizado em qualquer hemocultura sinalizada como positiva é a coloração de Gram, uma vez que as características morfotintoriais do microrganismo ali evidenciado irão direcionar para a antibioticoterapia. Portanto, o resultado parcial de hemoculturas deve ser considerado de alta prioridade para notificação ao médico.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). Clin Infect Dis. 2013;57:e22-121.
2. Mermel LA, Allon M, Bouza E, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009;49:1-45.

Marcelo Pilonetto ▪ Pedro Alves d'Azevedo

Líquor

ASPECTOS GERAIS

Fisiopatologia

O tecido do Sistema Nervoso Central (SNC) é muito delicado. Por esse motivo, apresenta um elaborado sistema de proteção que consiste de quatro estruturas: crânio, meninges, líquido cerebroespinhal (líquor) e barreira hematoencefálica (BHE). O líquor é um fluido aquoso e incolor que ocupa o espaço subaracnoideo e as cavidades ventriculares. O aspecto do líquor é de um líquido límpido e cristalino, como água de rocha. Também é conhecido como líquido cefalorraquiano (LCR). Sua função primordial é proteção mecânica do sistema nervoso central (SNC). O líquor atua no suprimento de nutrientes e na remoção de resíduos metabólicos do tecido nervoso. É produzido a uma taxa aproximada de 20 mL por hora pelos plexos coroidais. Seu volume total é de 6 a 60 mL em recém-nascidos, e 140 a 170 mL no adulto. Produzido pelo plexo coroide e pelo epitélio dos ventrículos e espaço subaracnoide, o líquido flui dos ventrículos através dos forames laterais e medial, preenchendo as superfícies cerebrais e espinhais dentro desse espaço. Sua reabsorção se dá nos vilos aracnoides, predominantemente ao longo do seio sagital superior. Não é simplesmente um ultrafiltrado do soro: é produzido por filtração através dos capilares coroides e subsequente secreção e transporte ativo bidirecional de substâncias pelas células epiteliais coroides. Designa-se barreira hematoencefálica uma barreira virtual efetuada pelas trocas bidirecionais entre o sangue, o líquor e o cérebro. Essa barreira, completamente desenvolvida no adulto, evita a penetração de certas substâncias como a bilirrubina, que podem ser tóxicas ao tecido nervoso. Em neonatos (em que a barreira hematoencefálica ainda não está completamente madura), a presença de bilirrubina em concentrações elevadas (hiperbilirrubinemia) é um problema comum, conhecido como icterícia neonatal.

Epidemiologia e alterações clínico-laboratoriais

Desde o final do século XIX a análise do líquido cefalorraquidiano vem sendo significativamente importante para o diagnóstico de doenças do SNC, entre elas: meningites, hemorragias, doenças inflamatórias, doenças neoplásicas, doenças desmielinizantes, esclerose múltipla, leucemias, linfomas, entre outras. O padrão liquórico nas infecções do SNC depende de algumas variáveis, como tempo de evolução, agente etiológico, atividade imunológica do SNC e integridade da BHE. Em linhas gerais existe, em maior ou menor grau, aumento da pressão liquórica, aumento do número de células e alterações de ordem bioquímica. Classicamente, os processos infecciosos podem ser divididos, de acordo com o período de evolução, em: agudos, subagudos e crônicos. Na fase aguda, o LCR mostra uma resposta celular com pleocitose, presença de neutrófilos e eosinófilos, e uma resposta humoral caracterizada pela quebra da BHE e consequente aumento dos teores de albumina. Na fase crônica, a resposta celular é pouco intensa, a BHE já se refez e existe produção intratecal de anticorpos específicos com aumento dos teores de globulinas γ. Além das características gerais e inespecíficas, o diagnóstico de vários agentes infecciosos no LCR pode ser feito diretamente, pela detecção de antígenos ou partículas genômicas por biologia molecular, aglutinação em látex e cultura, ou, indiretamente, pela determinação de anticorpos, por imunofluorescência indireta, hemaglutinação passiva ou ensaio imunoenzimático.

Nas meningites agudas bacterianas as três síndromes clássicas, ou seja, de hipertensão intracraniana, toxêmica e de irritação meníngea são acompanhadas por um líquor de aspecto turvo, apresentando pleocitose com predomínio ou exclusivamente à custa de neutrófilos, hiperproteinorraquia e hipoglicorraquia. Mais de 80% das meningites bacterianas agudas são causadas por *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *N. meningitis*, sendo que nos recém-nascidos devem ser considerados as enterobactérias e o estreptococo do grupo B.

O diagnóstico etiológico pode ser feito pelo encontro do agente etiológico no exame bacterioscópico direto (coloração de Gram) ou o seu crescimento em meio de cultura próprio. A dificuldade reside na sensibilidade de ambos os métodos, a qual pode variar de 60% a 85% no exame direto e de 70% a 85% na cultura. Além da visualização direta da bactéria, pode-se pesquisar a presença de antígenos bacterianos mais comuns por prova do látex. Esse método, que alia rapidez e grande sensibilidade, utiliza partículas de látex marcadas com anticorpos bacterianos específicos, que ao contato com

uma amostra de LCR contendo antígeno bacteriano reage com aglutinação visível a olho nu.

Do ponto de vista clínico, as meningites e as meningoencefalites virais apresentam sintomatologia mais branda e evolução autolimitada**.** Os vírus mais comumente relacionados a infecções do SNC são: Enterovírus, Flavivírus, Togavírus, Rabdovírus, Paramixovírus, Herpesvírus e adenovírus. Classicamente, o líquor nas meningites virais apresenta pleocitose menos intensa que nas meningites bacterianas agudas, a concentração de proteínas está discretamente elevada, e os teores de glicose e lactato tendem a ser normais. O echovírus é responsável por cerca de 60% das meningites virais. Algumas meningites causadas por enterovírus podem cursar, nas primeiras 24 horas, com pleocitose à custa de neutrófilos, hiperproteinorraquia pouco mais acentuada, e glicorraquia normal ou discretamente diminuída. Nesses casos, cabe ao médico-assistente levar em conta a evolução do paciente, que tende a ser benigna e, em caso de dúvida, proceder a uma nova análise do LCR em 24 horas, para observar a "virada" para o perfil linfomonocitário. Algumas meningites por enterovírus podem ser mais precisamente diagnosticadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

O diagnóstico do envolvimento neurológico pelo *Mycobacterium tuberculosis* é difícil, em virtude da baixa sensibilidade dos métodos ditos *gold standard*, como a micobacteriologia direta, pela técnica de Ziehl-Neelsen, e a cultura em meio de Löwenstein-Jensen. Geralmente, o diagnóstico e, consequentemente, o tratamento, são feitos com base nos achados clínicos associados à pleocitose liquórica e às alterações bioquímicas, sobretudo hiperproteinorraquia, hipoglicorraquia, e aumento da atividade enzimática da aminodeaminase (ADA) no líquor. Métodos que utilizam biologia molecular têm sido testados, quer no diagnóstico quer no seguimento terapêutico dos pacientes. Apesar de a especificidade ultrapassar 90%, a sensibilidade ainda é um pouco decepcionante, algo em torno de 50%, não muito maior que a sensibilidade do exame direto. Obviamente, todos os métodos se complementam. O clínico deve ter sempre em mente que o diagnóstico de envolvimento neurológico pelo *M. tuberculosis* não deve ser afastado apenas porque o exame direto ou o PCR resultaram negativos.

Por fim, o exame do líquido cefalorraquidiano é de fundamental importância no diagnóstico e no seguimento da neurossífilis. Assim, na fase ativa, os achados liquóricos são compatíveis com um processo inflamatório, revelando pleocitose e aumento da concentração proteica com hipergamaglobulinorraquia, sendo frequente e característica a presença de bandas oligoclonais. Os testes imunológicos específicos são utilizados para detectar anticorpos contra o *Treponema pallidum*, sendo pesquisados dois grupos de anticorpos, os não treponêmicos ou reaginas, e os treponêmicos. Faz parte do primeiro grupo o VDRL e do segundo grupo o FTA Abs (imunofluorescência indireta), a hemaglutinação passiva e o ELISA. A presença de uma reação de VDRL reagente em qualquer título é considerada como diagnóstico de neurossífilis, sendo esse exame usado, habitualmente, como *screening*. Embora de grande especificidade, a sensibilidade do VDRL é baixa, em torno de 30% a 70%. Os demais testes são considerados confirmatórios quando o VDRL é positivo. Resultados de ELISA inconclusivos ou indeterminados não podem indicar um nível muito baixo de anticorpos antitreponemas, ou podem ser devidos a fatores não específicos. Pacientes com neurossífilis, após tratamento específico, podem apresentar persistência de reações de VDRL e de ELISA por meses e anos, sem significado clínico, e que é reconhecido como cicatriz imunológica.

MÉTODOS LABORATORIAIS DE DIAGNÓSTICO

Coloração de Gram

A coloração de Gram clássica deverá ser efetuada imediatamente após a chegada do líquor no laboratório. Volume e aspecto devem ser analisados e reportados. O líquor dever ser centrifugado e uma amostra do sedimento corada. Pela rapidez do resultado é um exame importante em situações clínicas de urgência como nas meningites. Em razão de relativa baixa sensibilidade, resultados negativos não excluem a presença de microrganismos que podem ser detectados por cultura. A coloração de Gram possui sensibilidade de 60% a 85% quando realizada de maneira adequada (após sedimentação da amostra por centrifugação), sendo dependente da quantidade e do tipo de bactéria. Para bactérias anaeróbias e *Listeria* essa sensibilidade pode cair para valores inferiores a 50%.

Métodos de detecção direta de antígenos

A meningite bacteriana é uma doença de alta morbidade e mortalidade, sendo o diagnóstico laboratorial essencial para a melhoria da sobrevida dos pacientes acometidos por esta infecção. Pela necessidade de um diagnóstico rápido para os casos de meningite, os testes para detecção de antígenos se tornam essenciais. No presente capítulo abordaremos apenas os métodos mais utilizados e mais acessíveis aos laboratórios de rotina.

Testes de látex

Apesar do alto custo, esse tipo de método é fundamental para laboratórios que se localizam ou prestam serviço para hospitais, especialmente aqueles que têm pronto-atendimento.

A maioria dos *kits* disponíveis no mercado possibilita a pesquisa de *Neisseria meningitidis* (sorogrupos A, B, C, Y e W135), *Streptococcus penumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus agalactiae*/*Escherichia coli* K1.

O método para realização dessa pesquisa é relativamente simples: uma alíquota de líquor ou soro é diluída em tampão e fervida por 30 minutos. Depois, a amostra é centrifugada por 5 minutos. Então, 20 microlitros do sobrenadante é distribuído para cada anticorpo e controle em uma placa de aglutinação tradicional pelo látex. As gotas de amostras e reagentes são misturadas e colocadas em agitador por 2 minutos. A presença ou ausência de aglutinação é observada sob luz intensa. Uma vez que a amostra de LCR ou soro esteja no setor de Microbiologia, o tempo total de execução do exame é de aproximadamente 60 minutos.

Dentre as vantagens desse método estão: a praticidade, a rapidez, a pesquisa dos principais agentes etiológicos de meningites bacterianas, e dispensa o uso de equipamentos para leitura. Além disso, pode detectar antígenos de bactérias em culturas negativas (cepas inviáveis). Por outro lado, esse método não detecta patógenos menos frequentes, como *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae,* entre outros, tem baixa sensibilidade (22% a 100%, dependendo do estudo e do patógeno), e a leitura do teste pode ser subjetiva (presença ou ausência de aglutinação), dependendo da experiência do observador. Alguns autores recomendam que esse teste não seja mais utilizado. Porém, em nossa experiência prática em um laboratório central de saúde pública, esse teste ainda é importante como método preliminar em situações de emergência.

Já estão disponíveis no mercado testes para detecção de *N. meningitidis* por imunocromatografia, os quais podem, inclusive, diferenciar os principais sorogrupos. Entretanto, esses métodos não têm sido comercializados em nosso país, e, portanto, não são utilizados na maioria dos laboratórios de rotina do Brasil.

Métodos moleculares

A reação da polimerase em cadeia (PCR convencional), e a PCR em Tempo Real (qPCR), tem sido utilizada como excelente ferramenta tanto para acelerar o diagnóstico laboratorial das meningites como para aumentar a sensibilidade de detecção do agente etiológico. A sensibilidade varia de 88% a 100%, e a especificidade é de 100%. Devido à alta sensibilidade, devem ser tomados cuidados especiais com contaminações cruzadas, evitando assim falso-positivos.

Entre as vantagens do PCR está o tempo reduzido de execução total do teste (90 minutos), a maior sensibilidade em relação à cultura, especialmente em pacientes que já receberam antibióticos, e a possibilidade de pesquisar diversos patógenos ao mesmo tempo pela técnica de PCR Multiplex.

Embora a correlação com o prognóstico da doença ainda seja incerto, alguns autores têm proposto o uso do PCR em Tempo Real quantitativo para determinar a carga microbiana e observaram um desfecho desfavorável da meningite em casos com contagens bacterianas elevadas.

Outro avanço importante no diagnóstico molecular das meningites tem sido alcançado com o lançamento de máquinas integradas, como o PCR automatizado, que possibilita a extração, a amplificação e a detecção do produto de PCR em um só módulo (BD-MAX® – Becton & Dickinson, Baltimore, USA). Embora esse equipamento possa ser utilizado com *kits* comerciais, também possibilita o desenvolvimento de métodos *in house,* os quais podem ser adaptados para a pesquisa multiplex de patógenos comuns em meningite bacteriana, como *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae.* Em nosso laboratório tivemos a oportunidade de conduzir estudo de validação desse equipamento, segundo protocolo interno, cuja sensibilidade foi de 89%, e especificidade de 100% em relação ao método já padronizado de qPCR Multiplex não automatizado (dados não publicados).

Cultura

A cultura de LCR é considerada o método de referência para o diagnóstico das meningites bacterianas, tendo sensibilidade de até 85% em pacientes com contagem de leucócitos acima de 1.000/mm^3. Ainda, permite que seja realizado o teste de sensibilidade a antibióticos a partir da cepa isolada. As cepas de *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae* podem ser sorotipadas a partir dos isolados, orientando os dados epidemiológicos e as medidas de prevenção e controle dessa doença tão grave e preocupante.

Porém, a sensibilidade desse método diminui muito nos casos de pacientes que estão recebendo antibioticoterapia, podendo ser de 62% a 70%. Entretanto, o uso da cultura de LCR é muito restrito ou praticamente nulo nos casos de meningite viral, por protozoários e até mesmo em meningites fúngicas.

Cada laboratório pode estabelecer seu próprio procedimento para realizar a cultura de líquido cefalorraquidiano. Porém, alguns requisitos básicos devem ser sempre seguidos, como: usar meio de transporte rico (p. ex.: ágar chocolate inclinado, Transgrow ou T-I) de preferência contendo CO_2; sempre fazer a microscopia de Gram; semear em pelo menos um meio rico (p. ex.: ágar chocolate suplementado e ágar sangue); e incubar a placa por até 72 horas em tensão de CO_2.

Identificação do agente etiológico

Além do resultado da coloração de Gram e dos testes rápidos auxiliarem na identificação presuntiva do patógeno envolvido, a análise do crescimento nos meios de cultura também pode confirmar a suspeita e definir a espécie isolada, conforme observado na Tabela 37.1.

Tabela 37.1 Identificação presuntiva de *N. meningitidis, S. pneumoniae* e *H. influenza* baseada no crescimento em meios de cultura e nos resultados da coloração de Gram.

Crescimento em ACH	Crescimento em AS	Coloração de Gram	Identificação presuntiva
+	+	Diplococos Gram-positivos	*Streptococcus pneumoniae*
+	+	Diplococos Gram-negativos	*Neisseria meningitidis*
+	–	Cocobacilos pleomórficos Gram-negativos	*Haemophilus influenzae*

A S- ágar sangue; ACH - ágar chocolate.

Fonte: Adaptada de Shadid, 2011.

Neisseria meningitidis

O crescimento em ágar sangue e/ou chocolate de colônias circulares, úmidas e brilhantes, convexas, com bordas bem-definidas, de tamanho pequeno a médio, e oxidase positiva, cuja morfologia ao microscópio se apresenta como diplococos Gram-negativos sugere fortemente que o isolado seja uma *Neisseria meningitidis.* As colônias de *N. meningitidis* são cinza em ágar sangue e não apresentam pigmentos. Em ágar chocolate as colônias de *N. meningitidis* se assemelham às de *H. influenzae*. Cabe ressaltar que algumas cepas de *N. meningitidis* não crescem em ágar sangue, apenas em ágar chocolate.

A identificação definitiva é possível através das provas de oxidação de açúcares, usando como base o ágar CTA (Cistina-Tripticase-Ágar). A *N. meningitidis* fermenta os açúcares glicose e maltose, mas não fermenta a sacarose e a lactose.

Considerando os aspectos epidemiológicos, após a identificação é importante definir o sorotipo da cepa isolada. Embora existam 12 sorogrupos de *N. meningitidis,* apenas cinco são investigados de rotina: A, B, C, Y e W135. Essa determinação pode ser feita a partir da colônia isolada, utilizando a metodologia de aglutinação pelo látex.

Streptococcus pneumoniae

Essa bactéria geralmente requer tensão de CO_2 para se desenvolver *in vitro*. Nessas condições, apresenta bom desenvolvimento, tanto em ágar sangue quanto em ágar chocolate. As colônias se apresentam pequenas, cinza, úmidas (eventualmente mucoides), α-hemolíticas (esverdeadas). As colônias jovens de *S. pneumoniae* são muito parecidas com as de *Streptococcus viridans*. Entretanto, em colônias com mais de 24 a 48 horas de incubação elas começam a se tornar achatadas e com uma depressão central, conferindo o aspecto de alvo. Uma cepa mucoide pode ter um aspecto diferente do descrito anteriormente. O grau de mucosidade varia de acordo com o sorotipo. Outros fatores também podem influenciar, como o uso de meios recentemente produzidos e a atmosfera de incubação. Entretanto, as cepas mucoides mantêm a capacidade de produzir um halo esverdeado de α-hemólise ao redor das colônias.

A identificação presuntiva de *S. pneumoniae* se dá pela observação das características acima, somadas à observação de diplococos Gram-positivos, catalase negativa e sensibilidade ao disco de optoquina (halo ≥ 14 mm), observada em ágar sangue.

Para a identificação confirmatória de *S. pneumoniae* pode ser necessária a realização do teste da bile solubilidade, principalmente para cepas com suspeitas morfotintoriais dessa espécie, mas com resistência à optoquina (halo ≤ 14 mm) ou outros métodos avançados como identificação automatizada, PCR ou até mesmo a confirmação pelo teste de látex.

As cepas de *S. pneumoniae* isoladas do LCR, assim como do sangue, podem ser enviadas para laboratórios de referência em saúde pública para que seja realizada a sorotipagem desses isolados.

Haemophilus influenzae

Essa espécie vem sendo cada vez menos isolada do LCR, pelo fato de fazer parte do calendário de vacinação da população brasileira. Entretanto, os casos de meningite por *Haemophilus* costumam ser muito graves devido à sua virulência.

O *H. influenzae* não se desenvolve em ágar sangue, o que torna obrigatório o uso de ágar chocolate suplementado com fatores X (hemina) e V (NAD) nas culturas de LCR. Por outro lado, isso facilita sua identificação presuntiva, pois entre os principais isolados é o único oxidase negativa que só cresce em ágar chocolate. Suas colônias são grandes, lisas, convexas, incolores a cinza, e opacas em ágar chocolate. As cepas capsuladas geralmente são mais mucoides, menores, compactas e cinza. Não promovem hemólise ou descoloração do meio, mas apresentam odor pungente semelhante a indol ou hipoclorito.

A identificação presuntiva de *Haemophilus influenzae* é feita quando se observa um isolado de LCR, que cresce somente em ágar chocolate e cuja morfologia no Gram é de cocobacilos Gram-negativos pleomórficos. A identificação confirmatória pode ser realizada utilizando as provas de oxidase, satelitismo e necessidade de fatores X e V para o crescimento. A suspeita de *H. influenza* é confirmada quando temos uma cepa oxidase negativa, que precisa de ambos os fatores (X e V) para crescer em ágar Mueller-Hinton, e cresce somente ao redor da estria de *Staphylococcus aureus* no ágar sangue. Detalhes dessas provas podem ser obtidos na literatura especializada.

Outras espécies isoladas de LCR

Recém-natos

Em pacientes recém-natos deve-se suspeitar de micro-organismos diferentes dos supracitados. Se a microscopia do LCR indicar a presença de estreptococos dois a dois, em cadeias curtas ou longas, a principal hipótese é que se trata de *Streptococcus agalactiae*. Bactéria de alta virulência e que pode causar também septicemia e pneumonia no recém-nascido. Portanto, em crianças com suspeita de infecção neonatal, além do LCR pode ser orientada a coleta de amostra de sangue e lavado brônquico. As cepas de *S. agalactiae* se apresentam β-hemolíticas no ágar sangue e suas colônias são maiores que as de *Streptococcus pyogenes*. A prova de CAMP-teste é suficiente para identificar esse isolado em recém-natos. Em casos de dúvida pode ser utilizada a aglutinação pelo látex.

Outra espécie frequentemente isolada de recém-nato é a *Listeria monocytogenes*. Trata-se de um bacilo Gram-positivo curto, que pode ser facilmente confundido com um diplococo Gram-positivo. Cresce bem em ágar sangue, as colônias são pequenas, cinza, e com hemólise discreta, geralmente observada apenas após a remoção da colônia do ágar. A *Listeria* é catalase negativa. Sua identificação presuntiva se define quando um BGP curto, com β-hemólise, catalase negativa e motilidade típica em temperatura ambiente (forma de guarda-chuva) é isolado de recém-natos.

É importante destacar que os achados citoquímicos no LCR do paciente com meningite por *Listeria* pode ser bem

diferente do esperado, apresentando baixa celularidade, com predomínio de mononucleares e proteínas elevadas.

A *Escherichia coli* sorotipo K1 é uma bactéria capsulada que pode penetrar o LCR de recém-natos e causar meningite bacteriana aguda com certa frequência. Seu isolado é muito típico e de fácil identificação. A confirmação do sorotipo geralmente é feita pelo teste de aglutinação pelo látex.

Meningites pós-cirúrgicas

Traumas cranianos e cirurgias cerebrais geralmente deixam as meninges e o sistema nervoso central expostos a microrganismos que normalmente não têm capacidade de penetrar nessa região anatômica. Geralmente esse acesso se dá pela implantação de um dreno central (*shunt*), necessário para aliviar a pressão intracraniana. Desta maneira, os isolados envolvidos nesses casos costumam ser bem diferentes dos detectados nas meningites comunitárias.

Dentre as principais espécies isoladas podemos citar: *Acinetobacter baumannii, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis.*

Com exceção do *Acinetobacter baumannii*, que pode ser confundido na microscopia de Gram com uma *Neisseria meningitidis,* pela semelhança morfológica entre eles, as demais espécies são facilmente identificadas em laboratórios de rotina. Entretanto, a maior preocupação na detecção desses isolados é que a maioria deles é de origem hospitalar, e, portanto, bactérias multirresistentes (BMR). Sendo assim, o tratamento dessas meningites pode ser um desafio, e o laboratório deve informar rapidamente a suspeita dessas BMR ao médico-assistente e à CCIH.

Meningites no paciente imunocomprometido

O patógeno mais comuns em pacientes imunocomprometidos com meningite bacteriana é o *S. pneumoniae*, mas outros patógenos como *L. monocytogenes, E. coli, Salmonella* spp. e *S. aureus* também são frequentemente encontrados.

As duas principais espécies envolvidas em infecções atípicas do SNC de pacientes HIV/Aids são o *Cryptococcus neoformans* e o *Mycobacterium tuberculosis.*

O microbiologista deve estar atento para essas suspeitas e auxiliar o médico-assistente a formular a hipótese da presença desse agente etiológico em casos cujos resultados citoquímicos não sejam compatíveis com meningite bacteriana aguda e haja presença de sintomas meníngeos como febre, dor de cabeça, torpor, entre outros.

A investigação desses microrganismos atípicos é feita utilizando métodos específicos como tinta da china e cultura em ágar Sabouraud no caso da suspeita de *Cryptococus neoformans,* coloração de Ziehl e cultura para micobactérias em ágar Loweinstein ou equivalente para os casos suspeitos de *M. tuberculosis*

Meningites virais

As meningites virais têm um prognóstico mais favorável, e seu diagnóstico geralmente é estabelecido por alterações menos acentuadas nos exames citoquímicos, ausência de bactérias no Gram, exames de detecção de antígenos e cultura negativos. Ou seja: trata-se de um diagnóstico incompleto, por exclusão.

Com o recente avanço tecnológico das metodologias de PCR em tempo real e sua popularização nos laboratórios de Saúde Pública e nos laboratórios de grande porte, as meningites virais têm sido pesquisadas por esse método. Essas tecnologias estão abordadas em outro capítulo desta seção (Capítulo 12 – Métodos Moleculares)

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. Clin Microbiol Rev. 2010;23(3):467-92.
2. Carbonnelle E. [Laboratory diagnosis of bacterial meningitis: usefulness of various tests for the determination of the etiological agent]. Med Mal Infect. 2009;39(7-8):581-605.
3. Carrol ED, Guiver M, Nkhoma S, et al. High pneumococcal DNA loads are associated with mortality in Malawian children with invasive pneumococcal disease. Pediatr Infect Dis J. 2007;26(5):416-22.
4. Corless CE, Guiver M, Borrow R, et al. Simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococcus pneumoniae in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. J Clin Microbiol. 2001;39(4):1553-8.
5. Koneman EW. Diagnóstico microbiológico. 6.ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2006. p.1565.
6. Machado L dos R, Livramento JA, Vianna LS. Cerebrospinal fluid analysis in infectious diseases of the nervous system: when to ask, what to ask, what to expect. Arq Neuropsiquiatr. 2013;71(9B):693-8.
7. Modi S, Anand AK. Phenotypic Characterization and Antibiogram of CSF Isolates in Acute Bacterial Meningitis. J Clin Diagn Res. 2013;7(12):2704-8.
8. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, et al. Procedimentos básicos em Microbiologia Clínica. 3.ed. São Paulo: Ed. Sarvier, 2010. p.530.
9. Pilonetto M, Pilonetto DV. Procedimentos laboratoriais em Microbiologia- POPs em Microbiologia. Curitiba: Microscience, 1998. p.98.
10. Saunders N, Lee MA. Real-Time PCR: Advanced Technologies and Applications | Book. Health Protection Agency. Retrieved March 03, 2014. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.horizonpress.com/pcr3
11. Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, et al. Mecanismos das Doenças Infecciosas. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.642.
12. Shadid J. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae. WHO/CDC. 2.ed. p.311. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/WHO_IVB_11.09_eng.pdf
13. Shameem S, Vinod Kumar CS, Neelagund YF. Bacterial meningitis: rapid diagnosis and microbial profile: a multicentered study. J Communicable Dis. 2008;40(2):111-20.
14. Tuon FF, Rocha JL, Arend LN, et al. Treatment and outcome of nine cases of KPC-producing Klebsiella pneumoniae meningitis. J Infect. 2013;67(2):161-4.
15. Tuon FF, Rymsza AM, Penteado-Filho SR, et al. Should polymyxin be used empirically to treat infections in patients under high risk for carbapenem-resistant Acinetobacter? J Infect. 2011;62(3):246-9.

38

capítulo

Leandro Reus Rodrigues Perez ▪ Cícero Armídio Gomes Dias

Culturas de Vigilância

O laboratório clínico tem um papel relevante no controle de infecções em instituições de saúde e, para que este seja bem realizado, faz-se necessário um trabalho conjunto entre o laboratório e o Serviço de Controle de Infecções (SCI). Essa relação é muito especial. Cada instituição tem suas particularidades, e o laboratório deve estar atento às necessidades específicas. Culturas de vigilância sempre foram um componente nessa relação laboratório-SCI e, mais recentemente, a necessidade de culturas de vigilância dirigidas à detecção de portadores de microrganismos multirresistentes tem se intensificado. Instituições de saúde têm enfrentado problemas com microrganismos multirresistentes de maneira crescente, e entre as estratégias de controle das infecções causadas por esses microrganismos encontram-se as culturas de vigilância em pacientes carreadores. Em conjunto com o laboratório clínico, o SCI deve determinar quais combinações de microrganismo-perfil de resistência devem ser investigados. Para atender a essa demanda, laboratórios clínicos têm de estabelecer rotinas adequadas e eficientes para detectar microrganismos com um perfil de resistência específico. Na busca de métodos mais sensíveis, baratos, e que produzam resultados mais rápidos, há uma intensa investigação sobre esse tema.

Além da pesquisa de microrganismos multirresistentes em pacientes potencialmente portadores, o laboratório clínico é, por vezes, requisitado a realizar pesquisas em trabalhadores da saúde e de ambiente hospitalar. No entanto, para que esse tipo de pesquisa seja mais bem-direcionado, é necessário o estabelecimento de estratégias específicas para reconhecimento de fontes, em casos de investigação de surtos, e as consecutivas ações decorrentes destas. Duas questões merecem destaque nesse contexto: primeiramente, encontrar a cepa relacionada ao surto em determinados sítios anatômicos de profissionais de saúde, tais como mãos e narinas, não permite reconhecer a direção da transmissão e não determina que o profissional seja a fonte do surto; e, em segundo lugar, a busca deve ser direcionada a profissionais potencialmente implicados. Culturas realizadas indiscriminadamente levam a resultados pouco confiáveis, que pobremente contribuem para elucidar o surto. Por fim, é necessário considerar que, controlado o surto, as atividades devem ser suspensas.

Culturas de algumas fontes ambientais (superfícies, equipamentos, água, alimento, ar, leite materno) são utilizadas em algumas instituições para finalidades específicas. O ambiente hospitalar pode servir como fonte de disseminação de microrganismos, contudo procedimentos para detecção devem ficar restritos a situações especiais, como monitoramento biológico de processos de esterilização e culturas de água de diálise e hemodiálise. Avaliação microbiológica da efetividade de processos de limpeza e desinfecção deve ser empregada muito seletivamente (para enterococos resistentes à vancomicina e bastonetes Gram-negativos produtores de carbapenemases, por exemplo). Análise do ar para detecção de esporos de fungos pode fazer parte de investigações especiais envolvendo pacientes altamente imunocomprometidos. Em geral, o laboratório clínico não conta com as melhores ferramentas para culturas de fontes ambientais e direcionar essas atividades a laboratórios especializados em microbiologia ambiental produz resultados mais confiáveis.

Feitas essas considerações iniciais, este capítulo será direcionado a culturas de vigilância em pacientes potencialmente portadores de microrganismos multirresistentes: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, enterococos resistentes à vancomicina, e enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTES À METICILINA (MRSA) EM PORTADORES

O microrganismo e a resistência

MRSA é um microrganismo frequentemente implicado em infecções associadas a cuidados de saúde. A resistência é devida à produção de uma proteína ligadora de penicilina, com baixa afinidade aos betalactâmicos. Esta característica é conferida pela aquisição do gene *mecA*, embora outros mecanismos, de menor prevalência, possam estar envolvidos.

POR QUE PESQUISAR MRSA?

A transmissão de MRSA entre pacientes de uma mesma instituição e entre instituições é bem-documentada por técnicas de epidemiologia molecular. Estudos demonstraram que a realização de culturas de vigilância dirigidas à detecção

de portadores com consequente uso de precauções de contato, levaram à redução significativa de índices de pacientes colonizados e infectados por MRSA. Além da utilização de precauções de contato direcionadas a pacientes com MRSA, a detecção de portadores de MRSA permite a execução de uma estratégia do tipo *search and destroy*, ou seja, o portador é reconhecido e o microrganismo é erradicado mediante procedimentos específicos. Assim, eliminado o estágio de portador, é possível impedir a transmissão do agente para outros pacientes. A estratégia é particularmente recomendada para MRSA por uma combinação de fatores: 1) o microrganismo é encontrado na pele (ou, mais precisamente, no vestíbulo nasal) e pode ser buscado em espécimes de fácil obtenção (*swab* nasal, por exemplo); 2) é possível implementar procedimentos de descolonização, com base em tratamento com pomada de mupirocina intranasal e banhos de antissépticos como a clorexidina. Por fim, a erradicação pode ser verificada mediante culturas pós-descolonização. Desta forma, para vigilância de portadores de MRSA é possível estabelecer uma cadeia de procedimentos que resultam na diminuição da colonização e da transmissão.

ONDE BUSCAR MRSA?

Culturas de *swabs* de vestíbulo nasal de potenciais portadores estão na base dos programas de vigilância de MRSA. Além de ser uma amostra de fácil obtenção, esse sítio é tradicionalmente associado à colonização por *Staphylococcus aureus*. Investigações mais recentes indicam que outros sítios podem também conter MRSA. Ainda, uma proporção de pacientes com culturas positivas para sítios extranasais podem apresentar resultados negativos para MRSA na amostra do vestíbulo nasal. Essas observações sugerem que indivíduos colonizados exclusivamente em sítios extranasais podem representar um importante reservatório não reconhecido de MRSA em hospitais. Uma revisão sistemática recentemente publicada indicou que triagem extranasal para MRSA pode aumentar o rendimento em aproximadamente um terço em relação ao vestíbulo nasal isoladamente. Culturas de sítios como orofaringe, reto, feridas e axilas aumentam o rendimento da detecção de portadores de MRSA.

COMO DEVE SER FEITA A CULTURA PARA MRSA?

A detecção de MRSA em portadores para fins de vigilância obedece aos princípios básicos das culturas feitas dentro do enfoque clínico. Contudo, a utilização de meios de cultura cromogênicos aumenta significativamente a detecção de MRSA. Um meio de cultura ideal para detecção de portadores de MRSA deve apresentar características básicas como: 1) algum componente que iniba outros microrganismos, permitindo a utilização em locais com uma microbiota variada; 2) adição de oxacilina ou outro betalactâmico para selecionar os estafilococos resistentes; 3) a presença de um componente indicador, com um padrão de cor específico para reconhecimento de *S. aureus*. Há meios de cultura comercialmente disponíveis que atendem a essas necessidades. Além do aumento no rendimento, meios cromogênicos diminuem a carga de trabalho, o gasto com insumos relacionados, e o tempo de detecção de MRSA.

ENTEROCOCOS RESISTENTES À VANCOMICINA (VRE)

O microrganismo e a resistência

O gênero *Enterococcus* apresenta espécies de interesse clínico como *Enterococcus faecalis* e *E. faecium*. Podem causar uma variedade de infecções (urinárias, bacteremias, sítios cirúrgicos), em geral atuando como oportunistas. Enterococos são intrinsecamente resistentes a vários antimicrobianos, todavia a resistência adquirida à vancomicina é de especial importância em infecções associadas a cuidados de saúde. Diversos genes podem conferir resistência à vancomicina entre enterococos e destacam-se os genes *vanA* e *vanB*. No Brasil, tanto *E. faecalis* quanto *E. faecium* têm sido responsáveis por surtos de infecções em diferentes localidades há mais de uma década.

POR QUE PESQUISAR VRE?

Técnicas de epidemiologia molecular têm dado suporte ao conceito de transmissão de VRE entre instituições de todo o mundo. A exposição aos antimicrobianos é considerada um fator de risco para aquisição de VRE. Por outro lado, quanto maior a presença de colonização por VRE, maior a chance de transmissão cruzada. Deste modo, ações focadas na prevenção de infecções cruzadas (no caso, precauções de contato) têm maior impacto do que, por exemplo, medidas direcionadas ao controle do uso de antimicrobianos. Essas ações envolvem o reconhecimento de pacientes que se encontram na condição de portadores de VRE. É necessário reconhecer que, ao contrário de MRSA, em que o estado de portador pode ser eliminado pela adoção de medidas de descolonização, para VRE não há procedimentos validados para este fim.

ONDE BUSCAR VRE?

Embora possa ser encontrado em outros sítios, enterococos habitam o intestino humano como integrantes da microbiota normal. VRE devem ser buscados nas fezes ou, por maior conveniência, em *swabs* retais.

COMO DEVE SER FEITA A CULTURA PARA VRE?

Assim como na detecção de MRSA, a busca de portadores de VRE para fins de vigilância obedece aos princípios básicos das culturas feitas dentro de um enfoque clínico. A combinação de inibidores para outros microrganismos e indicadores da presença de VRE facilita a detecção desses microrganismos, sendo especialmente pela natureza polimicrobiana do local da pesquisa de VRE. Meios de cultura cromogêni-

cos encontram-se comercialmente disponíveis e aumentam significativamente a detecção de VRE e diminuem a carga de trabalho, o tempo de detecção e os gastos com outros insumos.

ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS (ERC)

O microrganismo e a resistência

A emergência de ERC tem provocado uma preocupação global. As limitações para tratamento das infecções causadas por esses microrganismos e a mortalidade decorrente são o produto final de um processo. Diferentes carbapenemases produzidas por enterobactérias já foram descritas, com destaque para os tipos IMP, VIM e NDM (metalobetalactases), OXA e KPC. Os genes responsáveis pela síntese dessas enzimas são facilmente transmitidos por intermédio de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons. ERC são disseminadas internacionalmente e seu controle tem se revelado particularmente difícil. As medidas para controle da disseminação de ERC ainda não estão bem-estabelecidas, embora a vigilância de portadores seja reconhecida como um componente importante do processo.

É necessário considerar que a emergência de ERC não é um fenômeno isolado. Antes da existência de ERC, outros microrganismos Gram-negativos, como bastonetes Gram-negativos não fermentadores da glicose (*Pseudomonas* e *Acinetobacter*) pan e multirresistentes já causavam (e ainda causam) grandes problemas no âmbito hospitalar. Uma variedade de enzimas é reconhecida entre esses microrganismos, havendo, ainda, a coexistência de outros mecanismos de resistência, como impermeabilidade e sistemas de efluxo. Entre as enterobactérias, as produtoras de betalactamases de espectro ampliado (ESBL) são também reconhecidas e merecem menção.

POR QUE PESQUISAR ERC?

A ocorrência de ERC no Brasil é bem-documentada, sendo devida a diferentes enzimas (KPC, OXA-48 e NDM), em diferentes gêneros e espécies bacterianas, e em diferentes regiões do país. O reconhecimento por parte da Agência Nacional de Vigilância Nacional (Anvisa) da gravidade do problema apontou para a necessidade de controle da disseminação de ERC. Em abril de 2013, a Anvisa emitiu a Nota Técnica "Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multirresistentes" (NT01/2013) que estabeleceu, entre outros aspectos, medidas para a detecção precoce de pacientes colonizados.

ONDE BUSCAR ERC?

Swab retal ou fezes são usados para a pesquisa de ERC em portadores. Dados de um estudo indicam que a realização de culturas de *swabs* inguinais aumenta a detecção de portadores de enterobactérias produtoras de KPC.

COMO DEVE SER FEITA A CULTURA PARA ERC?

O procedimento descrito na NT 01/2013 é baseado nas recomendações do Centers for Disease Control and Prevention. Envolve uma etapa de enriquecimento em caldo seletivo seguida de subcultivo em meio sólido. Resumidamente, um tubo contendo 10 mL de caldo (soja tripticaseína ou *brain hearth infusion*) contendo um disco de 10 μg de ertapenem é inoculado. Após 12 a 18 horas de incubação a 36 °C, o material é subcultivado em ágar MacConkey por esgotamento. À superfície da placa semeada são acrescentados discos de ertapemem, no início e no final das estrias. Após incubação por 18 a 24 horas a 36 °C a placa é inspecionada. A seguir, são usados testes fenotípicos para comprovação da presença de ERC.

As recomendações da NT01/2013 são simples, de fácil execução, e podem ser seguidas em qualquer laboratório clínico. Contudo, há interesse na busca de procedimentos que tornem o processo mais simples, acurado, barato e com menor tempo de execução. Essas investigações incluem a utilização de meios alternativos, tanto *home made* (em geral com acréscimo de antimicrobianos que aumentem a seletividade) quanto comercializados (diferentes meios cromogênicos estão aqui incluídos). Por ser um tema de investigação recente, não é ainda possível atribuir a algum desses procedimentos alternativos uma superioridade definitiva em relação aos recomendados na NT01/2003 na detecção de ERC. Convém destacar que o desempenho desses procedimentos alternativos pode variar com o microrganismo e o padrão de resistência predominante em uma instituição específica. Portanto, a adoção de um procedimento alternativo deve ser embasada em estudo de validação que tenha como referência a NT01/2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Microrganismos multirresistentes, como MRSA, VRE e ERC constituem-se em importante problema de saúde pública global. Esforços para impedir a disseminação desses agentes incluem a detecção de portadores entre pacientes de risco, por intermédio de culturas de vigilância. O laboratório clínico é um componente central nesse processo, e um entrosamento com o SCI é fundamental para o estabelecimento de estratégias e o aproveitamento dos dados produzidos.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Agência Nacional de Vigilância Satinária. Nota Técnica n 01/2013. Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multiresistentes. Brasíla, 2013.
2. Diekema DJ, Peterson LR. Point-counterpoint: To Screen or not to Screen for Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol. 2010;48:683-9.
3. Diekema DJ, Pfaller MA. Infection Control Epidemiology and Clinical Microbiology. In: Versalovic J, Carrol KC, Funke G, et al. Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM Press, 2011. p.73-84.

4. Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, et al. SHEA Guideline for Preventing Nosocomial Transmission of Multidrug-Resistant Strains of Staphylococcus aureus and Enterococcus. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003;24:362-86.

5. Savard P, Carrol KC, Wilson LE, et al. Yhe challenges of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and Infection Prevention: Protecting Patients in the Chaos. Infect Control Hosp Epidemiol. 2013;34:730-9.

39

capítulo

Jorge Sampaio ▪ Afonso Luís Barth

Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

INTRODUÇÃO

A primeira década do século XXI se caracterizou pela redução significativa dos investimentos na descoberta de novos antimicrobianos, particularmente aqueles ativos contra bacilos Gram-negativos, e pela emergência de enterobactérias produtoras de carbapenemases. Essas enzimas são capazes de degradar eficientemente os carbapenêmicos, antimicrobianos amplamente utilizados no tratamento empírico de infecções graves. Nesse cenário, os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos) têm papel fundamental no ajuste da conduta terapêutica. Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos, também denominados antibiogramas, visam a avaliar *in vitro* a interação do antimicrobiano com a bactéria, tendo como objetivo principal determinar se uma bactéria é capaz de expressar resistência aos agentes utilizáveis para tratamento da infecção. Sendo a resistência intrínseca conhecida para a maioria dos organismos, os testes são desenvolvidos para detectar resistência adquirida. Desse modo, o teste é útil para bactérias com perfil de sensibilidade variável, sendo desnecessário para algumas combinações para as quais não tem sido detectada resistência, a exemplo de *Streptococcus pyogenes* e penicilina.

É importante salientar que os testes são uma medida *in vitro* e que o resultado final da utilização de um agente antimicrobiano depende da interação de três fatores: o paciente, a bactéria e o antimicrobiano. O antibiograma reflete primordialmente duas variáveis: o fármaco e a bactéria, sem levar em consideração, na maioria das vezes, os aspectos clínicos que acompanham o processo infeccioso, por exemplo, a concentração do antimicrobiano atingida no sítio infeccioso ou o estado imunológico do paciente. A questão da concentração no sítio infeccioso é particularmente notada no caso do trato urinário, pois, uma vez que alguns antibióticos são fisiologicamente ali concentrados, os resultados do teste (padronizados para concentrações sanguíneas do fármaco) podem não ter correspondência clínica. O melhor exemplo é quando o teste apresenta resultado resistente em isolados de infecções do trato urinário e há resposta clínica.

Os resultados do teste têm alto valor preditivo negativo, mas valor preditivo positivo baixo, ou seja, resultados de sensibilidade não são absolutos, especialmente porque o teste não detecta todos os tipos de resistência. Porém, um resultado "resistente" no antibiograma diminui drasticamente as chances de sucesso clínico. Há alguns anos o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) introduziu o conceito de sensibilidade dose-dependente para interpretação dos testes de sensibilidade para cefepima. Tal conceito já era aplicado para algumas espécies de *Candida* ao testar azólicos. Essa categoria indica que a sensibilidade é dependente da dose utilizada no tratamento. Considerando que a categoria intermediário tem conceito muito similar, e que todos os betalactâmicos, em particular os carbapenêmicos, também têm resposta dependente da dose utilizada, é recomendável seguir as recomendações do BrCAST (Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) que não utiliza esta categoria, que do nosso ponto de vista, parece ser apenas um complicador adicional para o clínico ao interpretar antibiogramas.

Os métodos moleculares atualmente disponíveis detectam genes de resistência; portanto, são capazes de predizer apenas a resistência e não a sensibilidade. Por esse motivo, não são considerados testes de sensibilidade e não serão tratados neste capítulo.

MÉTODOS DISPONÍVEIS PARA AVALIAR A SENSIBILIDADE BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

Várias metodologias de testes de sensibilidade foram padronizadas por comitês internacionais. O CLSI e o EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) têm metodologias semelhantes, mas diferem quanto à potência de alguns discos de sensibilidade e critérios inter-

pretativos. Até o momento da redação deste texto ainda não há legislação que defina qual comitê os laboratórios clínicos brasileiros devem utilizar. Nesse sentido, há uma heterogeneidade quanto à padronização dos testes de sensibilidade. Visando a padronização dos destes de sensibilidade aos antimicrobianos, a SBAC, SBI, SBM e SBPC-ML assinaram um acordo de cooperação técnica criando o BrCAST - Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade Antimicrobiana - "Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" - , em 2013. O BrCAST é reconhecido pelo EUCAST como o comitê oficial de testes de sensibilidade do Brasil, e tem autorização do EUCAST para traduzir todos os documentos para Português. Todos os documentos necessários para a implementação do EUCAST/BrCAST estão disponíveis gratuitamente no endereço eletrônico www.brcast.org.br e são atualizados anualmente. O BrCAST tem interagido com o Ministério da Saúde e com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária para que haja uma legislação que defina as normas do EUCAST/BrCAST como o padrão a ser seguido em todos os laboratórios clínicos no Brasil.

Apesar dos documentos do CLSI terem até o momento maior uso pelos laboratórios no Brasil, tem sido necessária a complementação com pontos de corte estabelecidos no EUCAST/BrCAST. Os exemplos mais críticos são tigeciclina e polimixinas ao testar *Enterobacterales*, antimicrobianos para os quais não há pontos de corte definidos no CLSI, mas apenas no EUCAST/BrCAST. Outro exemplo é a fosfomicina: apenas no EUCAST/BrCAST há definição de pontos de corte para utilização da forma intravenosa. Os documentos desses comitês contêm tabelas para interpretação dos testes e sugestão de agentes a serem utilizados para bactérias fastidiosas e não fastidiosas, incluindo comentários relacionados à terapia e a precauções especiais de interpretação. Nas tabelas do CLSI os agentes sugeridos para os testes são divididos em grupos de prioridade: grupo A (devem ser testados e relatados de rotina), grupo B (devem ser testados de rotina e relatados seletivamente), e grupo C (suplementar para utilização em casos especiais e bactérias muito resistentes). Além desses, há um grupo de agentes recomendados para bactérias isoladas do trato urinário (grupo U).

Entre os métodos disponíveis para avaliar a resistência bacteriana, são mais utilizados, no laboratório clínico, os métodos que medem a atividade de um ou mais agentes diretamente contra a bactéria isolada, que pode ser qualitativo ou quantitativo.

O **método qualitativo** mais utilizado é o de disco-difusão, também conhecido pelo nome de seus criadores, Kirby e Bauer. Essa técnica utiliza discos de papel de filtro com diâmetro de 6 mm impregnados com concentrações fixas de antimicrobianos. Os halos de inibição são aferidos e categorizados como: "sensível" ("S"), "intermediário" ("I"), ou "resistente" ("R") conforme tabelas publicadas pelos comitês, a exemplo daquelas disponíveis nos endereços: www.brcast.org.br ; www.eucast.org.br; www.clsi.com (Tabela 39.1).

Os **métodos quantitativos** determinam a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração do antibiótico capaz de inibir o crescimento bacteriano. O resultado reflete a concentração do fármaco necessária para inibir o crescimento da bactéria em mg/L (ou µg/mL). Essas concentrações podem ser avaliadas de forma absoluta ou interpretadas como os resultados categorizados anteriormente (Tabela 39.1).

A categoria **"sensível"** indica que a concentração atingida pelo antimicrobiano no sítio da infecção (sangue), após dose usual, é maior do que a concentração necessária para inibir o crescimento daquela bactéria, ou seja, a infecção pode ser

Tabela 39.1 Exemplo de estrutura de tabela utilizada pelo BrCAST-EUCAST.

Penicilinas[1]	Ponto de corte p/ CIM (mg/L)			Conteúdo do disco (µg)	Ponto de corte p/ diâmetro do halo (mm)		
	S ≤	I	R >		S ≥	I	R <
Ampicilina	8[1]	-	>8	10	14[A,B]	-	<14[B]
Ampicilina-sulbactam	8[1,2]	-	>8[2]	10-10	14[A,B]	-	<14[B]
Amoxicilina	8[1]	-	>8	-	Nota[C]	-	Nota[C]
Amoxicilina-ácido clavulânico	8[1,3]	-	>8[3]	20-10	19[A,B]	-	<19[B]
Amoxicilina-ácido clavulânico, apenas para Infecção do trato urinário (ITU) não complicada	32[1,3]	-	>32[3]	20-10	16[A,B]	-	<16[B]
Piperacilina-tazobactam	8[4]	16	>16[4]	30-6	20	17-19	<17

Fonte: www.brcast.org.br

tratada com a dose recomendada para o caso. Na categoria **"resistente"**, a concentração atingida pelo antimicrobiano no sangue é menor do que a necessária para inibir o crescimento, ou seja, a infecção provavelmente não será debelada pela concentração alcançada por aquele agente. A categoria **"intermediário"** significa que a concentração do antibiótico necessária para inibir o crescimento bacteriano se aproxima dos níveis sanguíneos atingíveis pelo antimicrobiano, indicando que a infecção pelo agente isolado pode ser tratada em sítios corpóreos em que a droga é fisiologicamente concentrada ou quando uma dosagem alta pode ser usada. Essa categoria também serve para minimizar variabilidades de medição inerentes ao método que poderiam causar discrepâncias na interpretação. Outras categorias como "sensível dose-dependente" (como mencionado acima) e "não sensível" também são utilizadas pelo CLSI em situações particulares.

TESTE DE SENSIBILIDADE POR DISCO-DIFUSÃO

O método de disco-difusão avalia a resposta da bactéria diante de um gradiente circular gerado por um disco contendo antimicrobiano. A interpretação do diâmetro do halo de inibição é definida correlacionando-se com os níveis séricos atingidos após doses usuais em pacientes em condições de normalidade.

No método de disco-difusão, um inóculo padronizado da bactéria, obtido a partir de crescimento recente em meio não seletivo, preparado em solução salina a 0,85% estéril, e com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland (o que equivale a $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias - UFC/mL), é semeado em placa contendo meio de cultura específico. O meio padronizado é o ágar Mueller-Hinton, sem suplementação para a maioria dos bacilos Gram-negativos, *Staphylococcus* e *Enterococcus*; com suplementação com sangue de carneiro ou de cavalo para *Streptococcus*. No caso de *Haemophilus* utiliza-se o meio de HTM (CLSI) ou o MH-F (Mueller-Hinton com sangue de cavalo e β-NAD) (EUCAST/BrCAST). Três aspectos essenciais são o pH do meio (7,2 a 7,4), a espessura (4 mm) e a concentração de cátions divalentes. Após evaporação do excesso de umidade, os discos de antimicrobianos a serem testados são aplicados na superfície do meio de cultura. Após incubação (16 a 20 horas a 35 °C ± 1 °C em ar ambiente para microrganismos não exigentes, e em 5% de CO_2 para os exigentes), o diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano, porventura formada ao redor do disco, é aferido em milímetros. Essa medida é interpretada, conforme as tabelas dos documentos de padronização (CLSI ou EUCAST/BrCAST), como "R", "I" ou "S", conforme mencionado acima.

O teste tem diversas variáveis. Portanto, a utilização regular (pelo menos semanal) de cepas de controle de qualidade é essencial para validação e garantia da qualidade dos resultados (os detalhes dos procedimentos de controle de qualidade do antibiograma serão apresentados em outro capítulo se referem ao CLSI). Os detalhes de procedimentos de controle de qualidade segundo o BrCAST/EUCAST estão disponíveis no endereço www.brcast.org.br. Para garantir resultados adequados, condições analíticas relacionadas a meio de cultura, pH e incubação devem ser padronizadas. Embora fundamental, isso confere algumas limitações, como a impossibilidade de o teste laboratorial mimetizar o ambiente de infecção em que bactéria e antibiótico irão interagir, além de fatores particulares do paciente, tais como: inóculo bacteriano, pH, atmosfera e concentração de cátions, os quais podem diferir significativamente, dependendo do sítio de infecção. Apesar das limitações, o teste fornece dados valiosos que, em conjunto com outras informações diagnósticas, permitem otimizar a terapia antimicrobiana.

MÉTODOS DE DILUIÇÃO

Os métodos de diluição são desenvolvidos para determinar (quantificar) a menor concentração do antimicrobiano capaz de impedir o crescimento *in vitro* do microrganismo. Essa diluição pode ser realizada em caldo Mueller-Hinton ou em ágar Mueller-Hinton. A diluição em caldo pode ser feita com volume de 1 mL ou mais (macrodiluição), ou com volume de até 0,1 mL (microdiluição). São preparadas diluições seriadas do antimicrobiano e um mesmo volume de suspensão bacteriana padronizada, obtida a partir de crescimento recente, é adicionada a cada um dos tubos/poços. No caso da diluição em ágar pode-se utilizar um replicador de Steers, que permite inocular simultanemante até 24 suspensões. Após incubação, a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano corresponde à concentração inibitória mínima (CIM) (Figura 39.1), que pode ser categorizada como "S", "I" e "R". Essa técnica é considerada padrão de referência para avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos.

A CIM deve ser determinada para antimicrobianos para os quais, embora exista um ponto de corte estabelecido, o teste de disco-difusão não é recomendado, a exemplo de polimixinas para bacilos Gram-negativos e vancomicina para *Staphylococcus* spp. Por se tratar de um método quantitativo, ele pode fornecer informações adicionais ao clínico, que podem contribuir na decisão da melhor terapêutica, sobretudo para pacientes graves e/ou com infecções por bactérias multirresistentes, situação na qual o número de opções terapêuticas é extremamente limitado. Contudo, a interpretação da CIM e a aplicação dessa informação na terapêutica do paciente dependem fundamentalmente do conhecimento dos padrões farmacocinéticos e farmacodinâmicos dos antimicrobianos. O melhor exemplo disso é a avaliação das CIMs para carbapenêmicos em enterobactérias produtoras de carbapenemases, como auxílio na decisão de manter ou não o carbapenêmico em terapia combinada.

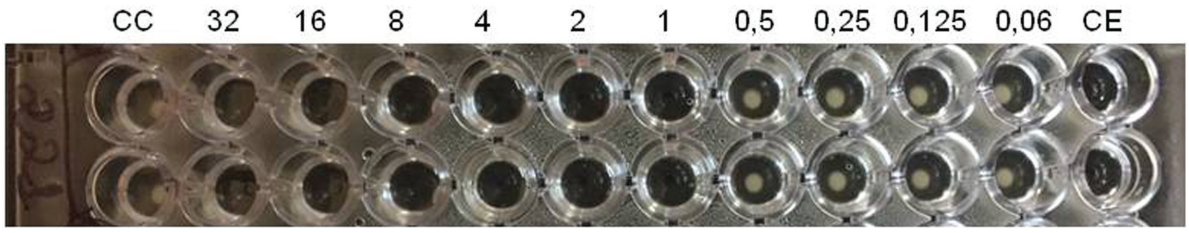


Figura 39.1 Técnica de microdiluição em caldo para determinação de concentração inibitória mínima. Amostra bacteriana testada em duplicada para polimixina B; valor da CIM = 1 μg/mL. "CC" = poço com controle de crescimento; "CE" = poço com controle de esterilidade; valores numéricos = concentração do antibiótico (μg/mL) em cada poço.

MÉTODO DE GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO EM FITA

Os métodos que utilizam gradiente de concentração de antibiótico são métodos de determinação da CIM, os quais utilizam uma fita plástica ou de papel de filtro que apresenta, de um lado uma escala de CIM em mg/L e, de outro, um gradiente de concentração do antimicrobiano. Dependendo do antimicrobiano, a concentração varia de 0,0016 a 256 mg/L ou de 0,002 a 32 mg/L. Embora esse método permita a determinação da CIM, a sua forma de realização é tão simples quanto a técnica de disco-difusão. Atualmente, os métodos de gradiente de concentração em fita comercialmente disponíveis no Brasil são o Etest® (BioMerieux), o M.I.C.E.® (OXOID) e as fitas da Liofilchem®.

A CIM é indicada pela interseção da inibição do crescimento bacteriano com a fita. Não havendo interseção, reporta-se a CIM como superior ao valor mais alto da fita. Se a interseção estiver abaixo da menor concentração do antibiótico presente na fita, reporta-se a CIM como igual ou inferior a este valor. Os critérios de interpretação utilizados são os mesmos empregados para os métodos dilucionais. Nesse aspecto deve-se tomar cuidado ao reportar os resultados. Como algumas fitas têm escalas que incluem valores que não constam nas tabelas disponíveis atualmente (CLSI e EUCAST/BrCAST), deve ser feito arredondamento para o valor imediatamente superior àquele detectado. Por exemplo, uma CIM de 1,5 mg/L para vancomicina obtida por gradiente em fita deve ser interpretada nas tabelas do CLSI ou EUCAST/BrCAST como 2 mg/L. A lógica da conduta baseia-se na admissão de que a premissa para o uso das tabelas do CLSI ou EUCAST é a equivalência entre os métodos dilucionais e de gradiente. Um isolado com CIM de 1,5 mg/L pelo gradiente em fita só seria inibido na concentração de 2 mg/L pela microdiluição ou diluição em ágar (Figuras 39.2 e 39.3).

O método é útil também para avaliação do efeito da combinação de dois antimicrobianos. Para isso, preparara-se a suspensão bacteriana, a partir de crescimento recente (24 horas), em salina 0,85% com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de MacFarland e dilui-se 1/20 (Etest®). Para a marca Liofilchem® não há orientação para diluição da suspensão. Semear a suspensão sobre o ágar MH de modo a inocular toda a superfície. Aplicar uma fita com antimicrobiano A (mais ativo), e duas fitas do antimicrobiano B. Deixar uma hora em temperatura ambiente. Remover uma das fitas do antimicrobiano B e posicionar uma nova fita de antimicrobiano A, exatamente sobre o mesmo local, no qual estava posicionada a fita removida. Para a marca Liofilchem® a recomendação do fabricante é posicionar as fitas transversalmente, uma sobre a outra. Fazer a leitura das CIMs e interpretar como sinergismo se houver redução de pelo menos quatro vezes no valor. Por exemplo: antimicrobiano A isoladamente 8 mg/L; A+B 2 mg/L. Essa metodologia, no entanto, não é padronizada nos documentos do CLSI ou EUCAST/BrCAST.

MÉTODOS AUTOMATIZADOS

Alguns equipamentos automatizados podem realizar testes de sensibilidade aos antimicrobianos, empregando painéis de microdiluição. Por essa metodologia, muitas vezes obtêm-se um valor de CIM aproximado, já que apenas algumas concentrações para cada antimicrobiano são testadas. Atualmente há três tipos de sistemas automatizados disponíveis no mercado nacional: Phoenix (Becton-Dickinson), Vitek2

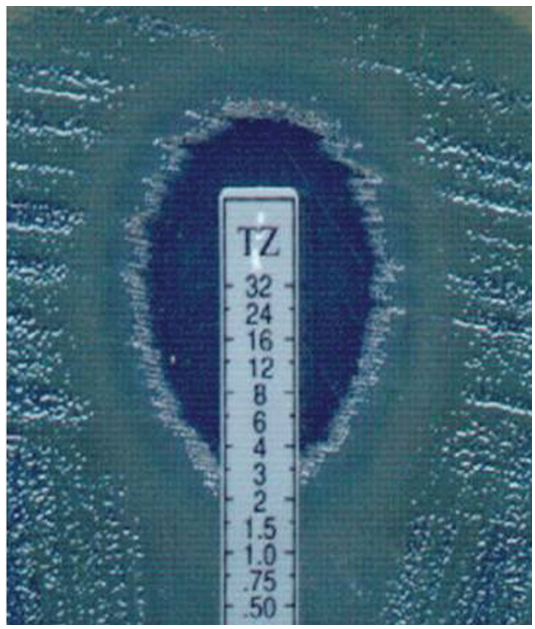


Figura 39.2 Técnica de gradiente de concentração em fita. Amostra bacteriana testada para ceftazidima; valor da CIM = 4 μg/mL

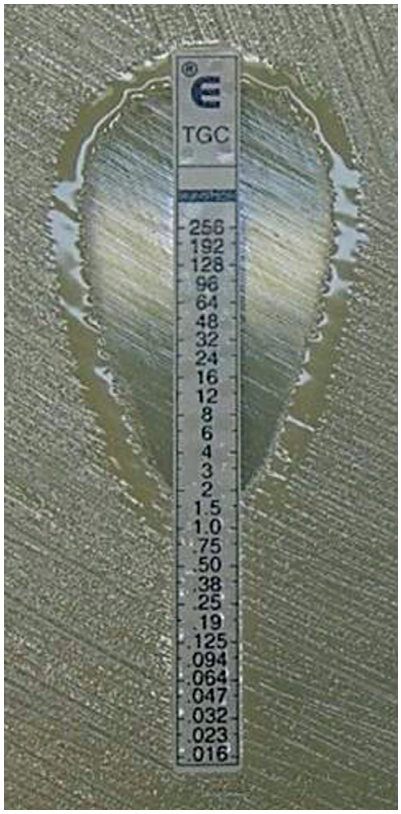


Figura 39.3 Técnica de gradiente de concentração em fita. Amostra bacteriana testada para tigeciclina; valor da CIM = 2 μg/mL

(bioMérieux) e MicroScan (Siemens). Todos se baseiam em microdiluição com incubação, leitura e interpretação automatizadas, associadas a uma base de conhecimento que filtra resultados e alerta o usuário quanto a inconsistências. As vantagens da automação são a padronização e a interpretação sem necessidade de intervenção humana, detecção de resultados inconsistentes, transferência de resultados por interface eletrônica. Alguns sistemas são capazes de liberar perfis de sensibilidade em seis horas, mas o resultado definitivo só deve ser liberado após a avaliação das placas de pureza. As principais limitações desses sistemas decorrem do fato de serem sistemas fechados. Nesses sistemas, há a obrigatoriedade do uso de painéis fixos de antimicrobianos, número limitado de diluições, que dificultam ou impedem a modificação dos critérios interpretativos. A principal limitação dos sistemas de automação é a falha na detecção de mecanismos de resistência emergentes. Podem ocorrem também falhas na detecção de resistência indutiva ou de subpopulações resistentes, em função do menor tempo de incubação ou menor inóculo.

SITUAÇÕES ESPECIAIS DE INTERPRETAÇÃO DO ANTIBIOGRAMA

Alguns casos de resistência não são detectados pelos métodos realizados na rotina laboratorial. A decisão de realizar métodos específicos de detecção de resistência depende da capacidade (técnica e financeira) do laboratório e será tão mais importante quanto maior o impacto clínico e a prevalência de bactérias resistentes no local.

Assim, existem algumas situações especiais tanto para realização do teste como para interpretação dos resultados.

Streptococcus pneumoniae

O método de disco-difusão determina se a amostra é sensível à **penicilina** e a outros betalactâmicos utilizando disco de oxacilina de 1 μg, ou seja, isolados com diâmetro do halo de inibição igual ou maior que 20 mm, com o disco de oxacilina, podem ser considerados sensíveis à penicilina, ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas de terceira e quarta gerações, independente do sítio de infecção, tanto no EUCAST/BrCAST quanto no CLSI. Nos casos de meningite, em que o isolado apresenta diâmetro do halo do disco de oxacilina menor que 20 mm, é necessário determinar a CIM utilizando a própria penicilina. No caso específico de meningite pneumocócica, é recomendada a determinação direta da CIM da penicilina, bem como do meropenem e da ceftriaxona ou cefotaxima, considerando-se a importância da rapidez da informação de possível resistência a esses antimicrobianos. Para essa finalidade o método mais amplamente utilizado é o do gradiente em fita. Um aspecto importante é que ao testar cepas mucoides com o gradiente em fita a turbidez da suspensão deverá ser equivalente ao padrão 1 e não ao padrão 0,5 da escala de McFarland, e a incubação deverá ser feita em estufa com 5% de CO_2, mas não em ar ambiente como recomendado pelo CLSI para métodos diluicionais. Outro detalhe importante é que a suspensão deverá ser feita em caldo BHI ou caldo MH, e não em salina 0,85%.

Enterococcus spp.

Visto que a resistência à **ampicilina ou penicilina** devido à produção de betalactamase pode não ser detectada usando-se métodos de disco-difusão e diluição, o CLSI recomenda a realização de um teste direto para detecção da enzima em amostras de sangue e líquor, com Cefinase®; um teste positivo prediz resistência à penicilina, assim como às amino, carboxi e ureidopenicilinas. Ao longo dos anos essa ocorrência mostrou-se extremamente rara, e até hoje não foi reportada no Brasil.

A resistência a **aminoglicosídeos** em *Enterococcus*, quando determinada por método de disco-difusão deve ser avaliada com discos de potência distinta daqueles utilizados para as demais bactérias. Devem ser utilizados discos de alta concentração de gentamicina (120 μg – CLSI ou 30 μg BrCAST-EUCAST) ou estreptomicina (300 μg). Ao liberar o resultado é recomendável que seja incluída observação indicando que a sensibilidade se refere a seu uso em associação com ampicilina, penicilina ou vancomicina. No caso de resistência a altos níveis de aminoglicosídeos (HLAR) não há efeito sinérgico quando da associação betalactâmico ou glicopeptídeo mais aminoglicosídeo. Recentemente tem sido

demonstrado o efeito sinérgico da associação da ampicilina com ceftriaxona. Apesar de não haver critérios interpretativos, o efeito sinérgico dessa associação pode ser avaliado utilizando-se o gradiente em fita e tem se mostrado uma alternativa importante em pacientes idosos com endocardite.

A resistência à **vancomicina** em *Enterococcus* spp. pode ser determinada pelo teste de disco-difusão na maioria das espécies de importância clínica (*E. faecalis* e *E. faecium*); no entanto, em espécies que apresentam resistência intermediária intrínseca, como *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, deve ser utilizando o método de microdiluição ou de gradiente em fita.

Staphylococcus spp. A resistência à oxacilina em *S. aureus* (MRSA) pode ser determinada por meio do teste de disco-difusão, mas deve ser utilizado o disco de cefoxitina. O teste com cefoxitina é menos afetado por temperatura de incubação e pode ser lido em 16 a 18 horas ao testar *Staphylococcus aureus*, mas deve ser incubado por 24 horas ao testar *Staphylococcus sp*. coagulase negativo (SCN). O resultado da cefoxitina é reportado como oxacilina no antibiograma. A resistência à oxacilina prediz resistência para todos os betalactâmicos, com exceção das novas cefalosporinas com atividade anti-MRSA (ceftaroline e ceftobiprole).

A resistência à vancomicina em ***Staphylococcus sp***. pode se apresentar de forma plena, intermediária ou heterogênea, sendo recomendada a determinação da CIM para este antibiótico, pois o método de disco-difusão convencional não é capaz de detectar adequadamente a resistência intermediária ou a heterogênea. Cabe mencionar que, para a teicoplanina, é mais sensato utilizar os critérios interpretativos para concentração inibitória mínima para teicoplanina definidos pelo EUCAST/BrCAST (Tabela 39.2).

A detecção da resistência heterogênea (hVISA) é um desafio para o laboratório clínico em função da inexistência de consenso quanto ao método mais adequado. A alternativa que atualmente apresenta maior sensibilidade (90%) e especificidade (95%) é a triagem em ágar BHI, contendo 1,6% de digerido pancreático de caseína e vancomicina na concentração de 4 μg /ml. Quatro *spots* de 10 μl, da suspensão com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de MacFarland de cada isolado são aplicados sobre a placa. O número de colônias deve ser verificado após 24 e 48 horas. A presença de duas ou mais colônias indica não sensibilidade à vancomicina. O isolado deve ser subsequentemente avaliado quanto à concentração inibitória mínima para vancomicina, e, se possível, deve ser feita análise populacional. São considerados hVISA *S. aureus* com CIM para vancomicina ≤ 2 μg/mL e positivos no teste de triagem com BHI e vancomicina. *S. aureus* com CIM de 4 ou 8 μg/mL são considerados intermediários, e com CIM ≥ 16 μg/mL são classificados como resistentes.

Outros mecanismos de resistência a serem verificados em *Staphylococcus* spp., bem como em *Streptococcus* spp., são aqueles que conferem resistência aos macrolídeos (eritromicina e claritromicina), e lincosamidas (clindamicina e lincomicina). Enquanto a expressão constitutiva de resistência à eritromicina e à clindamicina é detectável no teste de disco-difusão, a forma induzível (expressão de RNA metilases) pode apresentar falsa sensibilidade *in vitro* à clindamicina. Assim, no caso da bactéria apresentar resistência à eritromicina e sensibilidade à clindamicina, deve-se aproximaros dois discos para se avaliar possível resistência induzível à clindamicina (Teste D - Figura 39.4). O procedimento básico é o mesmo para disco-difusão, exceto pelo fato de que os discos de eritromicina e clindamicina devem ser dispostos a uma distância de 15 a 26 mm ao avaliar *Staphylococcus,* e 12 mm ao avaliar *Streptococcus.* O teste fundamenta-se no fato de que a eritromicina é capaz de induzir a expressão de RNA metilase. Um teste positivo caracteriza-se por um achatamento do halo de inibição da clindamicina, tomando a forma da letra D. Quando o "teste D" for positivo, o laboratório deve reportar resistência a ambos os agentes e considerar a inclusão do comentário: "A clindamicina ainda pode ser utilizada para tratamento de curta duração ou tratamento de infecções menos graves de pele e tecidos moles porque é improvável haver desenvolvimento de resistência plena durante tais tratamentos". É recomendável que o teste D seja realizado rotineiramente, e que seu resultado seja também incluído no antibiograma, de modo a informar ao clínico que a resistência induzida foi pesquisada.

Tabela 39.2 Pontos de corte para teicoplanina (mg/L).

	Sensível	Intermediário	Resistente	Comitê
S. aureus	≤ 2	–	≥4	Eucast
SCN	≤ 4	–	≥ 8	
S. aureus	≤ 8	16	≥ 32	CLSI
SCN	≤ 8	16	≥ 32	

SCN: *Staphylococcus* coagulase negativo.

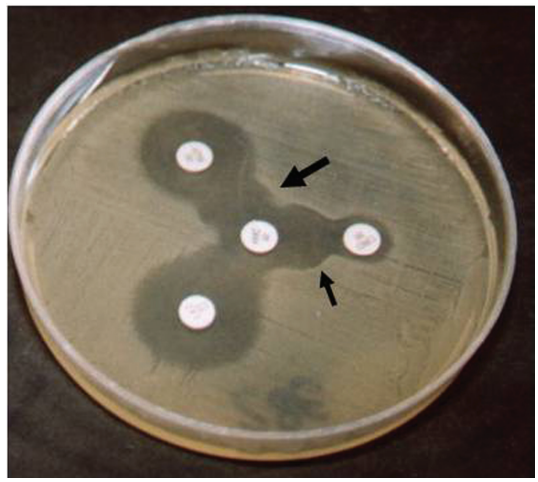


Figura 39.4 Técnica de aproximação de discos para detecção fenotípica de ESBL. No centro da placa coloca-se um disco de Amoxacilina/Clavulanato e ao seu redor discos de cefalosporinas. As setas pretas indicam o efeito típico de amostras ESBL positivas (aumento do halo das cefalopsorinas).

Outra limitação da disco-difusão é quanto à avaliação da sensibilidade à penicilina em *Staphylococcus*. O diâmetro do halo de inibição pode indicar sensibilidade, mas pode haver produção de betalactamase e resistência *in vivo.* Alguns trabalhos sugerem que o tipo de margem do halo de inibição pode ser utilizado para avaliar a produção de betalactamases. Halos mal- definidos (semelhantes a uma praia) são mais comuns em não produtores, enquanto halos bem-definidos (como um penhasco) são mais comuns em produtores de betalactamases; entretanto, a sensibilidade do método não é muito alta. Se considerarmos que a penicilina G praticamente não é mais utilizada para tratamento das infecções por *Staphylococcus*, e a baixa sensibilidade do teste para detecção de resistência, a conduta mais segura para o paciente é não testar a penicilina nos antibiogramas desse gênero bacteriano.

Bacilos Gram-negativos

A produção de **β-lactamases de espectro ampliado (ESBL)** é um dos principais mecanismos de resistência às cefalosporinas em enterobactérias, especialmente em *Klebsiella* spp. e *E. coli*. ESBL são usualmente codificadas por genes de localização plasmidial, o que explica a sua ampla disseminação entre diferentes espécies de enterobactérias. Uma das principais ESBLs no Brasil são as cefotaximases (CTX-Ms), enzimas capazes de degradar cefalosporinas, incluindo a cefepima (cefalosporina de quarta geração) e monobactâmicos (aztreonam), mas não são capazes de degradar carbapenêmicos ou cefamicinas (cefoxitina) . As ESBL constituem vários grupos, que variam quanto à eficiência cinética e à capacidade de expressar resistência *in vitro* aos diferentes compostos, o que pode dificultar sua detecção laboratorial no antibiograma de rotina. No entanto, as ESBL apresentam uma propriedade fenotípica comum: são inibidas pelo clavulanato de potássio. Assim, um teste simples e amplamente utilizado (método de Jarlier), que se baseia nessa propriedade, pode ser realizado no próprio antibiograma de rotina: coloca-se no centro da placa de Mueller Hinton o disco de amoxicilina/clavulanato e distante 20 mm, coloca-se discos de cefepima, ceftriaxona e ceftazidima. O aumento do halo para qualquer uma das cefalosporinas é indicativo da presença de ESBL (Figura 39.4). Essa abordagem é mais exequível do que aquela preconizada pelo CLSI, que tem critérios apenas para *Klebsiella pneumoniae, K. oxytoca, E. coli* e *P. mirabilis*, quando sabidamente esse mecanismo de resistência está amplamente disseminado e pode ser detectado em virtualmente qualquer espécie de enterobactéria. De 2006 a janeiro de 2010 a diretriz dos documentos do CLSI foi alterar para resistente a categoria das cefalosporinas e monobactâmicos se o teste de ESBL fosse positivo, visando a evitar falhas terapêuticas. A partir de 2010, o CLSI passou a preconizar pontos de corte para cefalosporinas que detectariam ESBL no teste de disco-difusão, não sendo mais necessária a realização de testes confirmatórios, a não ser por razões epidemiológicas ou por políticas de controle de infecção. Usando os novos critérios não há mais necessidade de editar os resultados do teste. Entretanto, essa recomendação ainda é bastante controversa, sobretudo no que tange aos valores de ponto de corte estabelecidos. Muitos laboratórios, até o momento, ainda optam por adotar o antibiograma interpretativo. Recomenda-se utilizar os pontos de corte, preconizados pelo BrCAST/EUCAST para cefalosporinas e continuar pesquisando ESBL em todas as enterobactérias pelo método de Jarlier, exclusivamente para fins epidemiológicos. Quanto ao resultado do antibiograma, as categorias não devem ser alteradas, mas deve ser incluído um alerta sobre doses de antimicrobianos, particularmente cefepima e ceftazidima, a cefalosporinas para as quais mais frequentemente observamos sensibilidade e produção de ESBL. Um exemplo de alerta a ser incluído nesses casos: as evidências clínicas atualmente disponíveis não garantem a eficácia do uso de cefalosporinas no tratamento de infecções graves por enterobactérias produtoras de betalactamase de espectro ampliado.

Carbapenemases

São enzimas que degradam antibióticos betalactâmicos, inclusive os carbapenêmicos. Devido à maior frequência de bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases, principalmente as carbapenemases do tipo KPC (de *Klebsiela pneumoniae carbapenemase)*, os critérios interpretativos para os carbapenêmicos foram revisados e re-estabelecidos pelo CLSI em 2010 para essa família. Até então, recomendava-se a utilização de um teste fenotípico para detectar possível produção de carbapenemase (teste de Hodge modificado) Com a modificação de pontos de corte proposta em 2010 pretendeu-se, pelo próprio resultado do antibiograma, diferenciar entre os produtores e não produtores dessas enzimas sem a necessidade de testes adicionais. Em contrapartida, alguns isolados de *Enterobacteriaceae*, não produtores de carbapenemases com CIM mais elevadas, mas dentro da faixa de sensibilidade, conforme os critérios anteriores, passaram a ser agora interpretados como intermediários ou resistentes aos carbapenêmicos.

Metalo-betalactamases (MBL)

As MBLs têm sido relatadas em diversos gêneros e espécies bacterianos. Essas enzimas necessitam de íons zinco para sua atividade de hidrólise do anel betalactâmico. Constituem um problema emergente em enterobactérias em todo o mundo. As enzimas mais importantes dentro desse grupo são as do tipo NDM (New Delhi Metalo-betalactamase), em função da rápida disseminação dos determinantes genéticos entre diferentes gêneros bacterianos. Até a entrada da NDM no Brasil, a MBL mais frequentemente detectada no Brasil em enterobactérias eram as do tipo IMP, particularmente IMP-1.

Apesar do antibiograma realizado com os critérios interpretativos atuais ser capaz de detectar a maioria absoluta dos produtores de carbapenemases do tipo KPC e NDM, em função de sua eficiência na degradação de carbapenêmicos, a

identificação presuntiva do tipo de carbapenemase tem importância epidemiológica.

Um método fenotípico bastante utilizado para identificação das carbapenemases é a técnica de disco combinado com bloqueadores enzimáticos com o uso do ácido fenilborônico para detecção de KPC e do EDTA para detecção de MBL. Esse método se baseia na comparação do diâmetro do halo de inibição de discos de imipenem e meropenem puros e adicionados de 10 µl de solução com 40 mg/ml de ácido fenilborônico (AFB) ou 10 µl de EDTA 0,1M. O teste com AFB pode ser utilizado em enterobactérias que não expressam AmpC cromossômica, a exemplo de *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, mas fornece resultados falsamente positivos em isolados do grupo CESP (*Citrobacter freundii, Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus vulgaris*, *Providencia* spp.). Um aumento no diâmetro do halo ≥ 5 mm, com os discos adicionados de AFB, para qualquer um dos carbapenêmicos, indica a produção de carbapenemase do tipo KPC ou raramente AmpC plasmidial. A diferenciação entre AmpC plasmidial e KPC pode ser feita pelo sinergismo observado com cloxacilina, quando adicionada aos discos de carbapenêmicos, nos produtores de AmpC plasmidial, mas não nos produtores de KPC .

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante enfatizar que o antibiograma é considerado apenas uma das variáveis para escolha da terapia, não garantindo que um agente antimicrobiano que apresente sensibilidade *in vitro* seja efetivo na terapia do paciente. É importante ressaltar, também, que os testes *in vitro* são feitos a partir de procedimentos padronizados, pois sem reprodutibilidade laboratorial não há bases científicas para a terapia. Contudo, a padronização gera limitações técnicas, sendo possível que a variabilidade de cada infecção e de cada paciente não seja contemplada no antibiograma. Por exemplo, os testes *in vitro* são feitos em condições semelhantes às fisiológicas. Enquanto penicilinas e cefalosporinas são ativas em larga escala de pH, em ambientes mais ácidos a atividade das tetraciclinas é melhor, enquanto a dos aminoglicosídios é significativamente reduzida. Isso significa que a ação antimicrobiana no sítio da infecção pode ser diferente daquela observada *in vitro*.

Assim, o antibiograma, seja ele qualitativo ou quantitativo, deve sempre ser interpretado à luz de dados clínicos, embora consista na melhor ferramenta no auxílio à readequação da terapia anti-infecciosa, atualmente disponível.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Anvisa 2013. Nota Técnica 01/2013. Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271858/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%BA+01+de+2013/5be89853-7eca-4b4b-98e4-5096b9f5a2ec
2. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth edition. CLSI document M07-A9 (ISBN 1-56238-784-7). Wayne: Clinical and laboratory Standards Institute, 2012.
3. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; approved Standard - Eleventh edition. CLSI Document M02-A11. Wayne: Clinical and laboratory Standards Institute, 2012.
4. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 27th edition. CLSI Suplement M100. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.
5. Cornaglia G, Courcol R, Herrmann J, et al. European Manual of Clinical Microbiology. 1st ed. Swiss: European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2012.
6. Etest Application Guide. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.biomerieux-usa.com/upload/Supplementary_Inserts_-_16273_-_B_-_en_-_EAG_-_Etest_Application_Guide-3.pdf
7. EUCAST. 2017. Clinical Breakpoint Table v. 7.0. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_7.0.pdf
8. Versalovic J, Carroll KC, Funke G, et al. Manual of Clinical Microbiology. 10.ed. Washington: ASM Press, 2011.

40

capítulo

Gustavo Pelicioli Riboldi ▪ Vlademir V. Cantarelli

Microbiologia Molecular

Os métodos para detecção de microrganismos e resistência aos antimicrobianos têm evoluído significativamente. Na rotina diária de um laboratório de microbiologia clínica os patógenos são detectados de forma diversificada. É bastante significativo o número de diagnósticos realizados por meio das técnicas clássicas de microscopia e cultura, por exemplo. A microbiologia convencional constitui, sem sombra de dúvida, um método de diagnóstico barato, porém necessita de tempo prolongado para que seus resultados estejam à disposição. No entanto, determinados problemas podem ocorrer, por exemplo, a necessidade de identificação de microrganismos que não possam ser cultivados ou, ainda, de microrganismos fastidiosos, exigentes e/ou de crescimento lento. Além disso, a interpretação dos resultados dessas culturas requer habilidade técnica extrema. Dessa forma, existe a necessidade constante do desenvolvimento de metodologias que permitam um diagnóstico rápido, dos mais diferenciados tipos de microrganismos, que vá além do poder das abordagens microbiológicas convencionais.

A descoberta da estrutura do DNA, em 1953, deu início à era do diagnóstico molecular de doenças infecciosas, o qual envolve a detecção e a caracterização de ácidos nucleicos (ribonucleico - RNA ou desoxirribonucleico - DNA) dos microrganismos envolvidos. O primeiro microrganismo a ter seu genoma completamente sequenciado foi *Haemophilus influenzae*, cuja sequência foi publicada em 1995 (Fleischmann *et al.*, 1995). Desde então, é crescente o número de microrganismos cujos genomas completos foram sequenciados, o que favoreu o desenvolvimento de inúmeros procedimentos diagnósticos inovadores. A maioria desses diagnósticos se baseia em técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs - *nuclei acid amplification tests*) a partir de uma amostra biológica, e os agentes patogênicos podem ser detectados em estratégias NAAT, qualitativos e/ou quantitativos por seleção de alvos específicos. O diagnóstico qualitativo está relacionado à identificação específica do agente patogênico envolvido no processo; já a identificação quantitativa permite, além dessa identificação, a verificação exata do número de cópias do material genético do microrganismo- alvo. Da mesma maneira, métodos moleculares diferenciados permitem, ainda, a tipagem molecular dos microrganismos, sua identificação a níveis de subespécie, experimentos esses muito utilizados para o controle microbiano da disseminação de microrganismos entre indivíduos tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade.

De maneira geral, o fluxo de trabalho de diagnóstico molecular no laboratório microbiológico é simples e direto. O ácido nucleico é extraído a partir da amostra clínica e submetido a um protocolo de detecção, na maioria das vezes através de NAATs. No entanto, esse fluxo de trabalho apresenta uma série de pontos-chave que podem originar problemas. Dentre eles, podemos destacar: protocolos de extração complicados; a utilização de amostras clínicas complexas (tais como sangue, fezes, escarro) com características pontuais, que venham a exigir protocolos adicionais de pré-extração; a utilização de produtos químicos tóxicos; a necessidade de otimização do ensaio; a confecção de oligonucleotídeos iniciadores específicos; entre outros. Além disso, o procedimento de diagnóstico molecular requer laboratórios separados fisicamente, principalmente para evitar a contaminação por produtos de amplificação.

Este capítulo tem como objetivo apresentar de forma sucinta as principais técnicas utilizadas atualmente no laboratório de microbiologia clínica, visando à identificação dos microrganismos. Também não serão descritas detalhadamente as técnicas de biologia molecular básica, embora o seu uso específico seja demonstrado para a identificação de microrganismos em amostras biológicas.

EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

O processo de extração de ácido nucleico constitui uma etapa pré-analítica crucial para ensaios moleculares. Métodos de extração ótimos para um microrganismo em um líquido biológico em particular podem não funcionar para outro microrganismo em outro tipo de amostra. Essencialmente, a arquitetura celular e da matriz onde o microrganismo se encontra é o fator determinante para o sucesso de diferenciadas metodologias de extração do material genético. A parede celular espessa de bactérias Gram-positivas, por exemplo, é mais difícil de ser rompida do que a parede de Gram-negativas; portanto, experimentos de extração precisam levar em considera-

ção fatos isolados e específicos relevantes a cada amostra de interesse. Um fator importante que influencia a escolha do método de extracção é a fonte das células bacterianas, isto é, se esta é proveniente de cultura de células ou de líquidos biológicos (de maior ocorrência na prática clínica). Isto se torna importante não somente devido à estratégia de extração utilizada, mas também por poder influenciar de maneira determinante os resultados posteriores da análise molecular. Substâncias que podem inibir reações de amplificação, tais como grupamentos heme provenientes do sangue ou sais biliares nas fezes, por exemplo, devem ser removidos por completo. Além disso, o desempenho dos procedimentos diagnósticos é influenciado pela pureza dos ácidos nucleicos-alvo. Assim, uma amostra de controle interno deve sempre ser introduzida para monitorar o processo de extração. Esse processo de controle é capaz de identificar o efeito de compostos inibidores de amplificação a partir da amostra clínica (tal como ureia ou hemoglobina), bem como a perda de amostra durante o processo de extração.

Procedimentos de extração de ácidos nucleicos possuem uma série de reagentes que possibilitam o isolamento específico do material genético a partir da complexa maquinaria macromolecular celular. Soluções de lise que apresentam pH elevado e detergente aniônico visando à solubilização de bicamada lipídica são utilizadas com o objetivo do rompimento de parede celular, desnaturação de proteínas e inibição de nucleases. Enzimas auxiliares, como Proteinase K e Lisozima, por exemplo, podem ainda ser utilizadas nessas soluções, pois auxiliam na dissolução da parede celular bacteriana. O cloreto de sódio é utilizado com o objetivo de romper ligações iônicas de cadeias peptídicas e auxiliar na dissociação de ácidos nucleicos. Pode, ainda, ser utilizado para auxiliar na precipitação do ácido nucleico (ao final do processo), embora o acetato de sódio seja preferencialmente utilizado para este fim, dada sua maior solubilidade em álcool. Solventes orgânicos atuam com a finalidade de precipitação de macromoléculas e desnaturação proteica. Protocolos clássicos para a extração de ácidos nucleicos envolvem a utilização de reagentes corrosivos, como soluções contendo fenol/clorofórmio, por exemplo, anteriormente ao processo final de precipitação com etanol. No entanto, o uso de fenol não é recomendado no laboratório clínico devido às suas propriedades cáusticas e corrosivas, à pobre reprodutibilidade do processo, e a possíveis dificuldades na automação. Etanol é utilizado com a finalidade de precipitação dos ácidos nucleicos, permitindo sua separação dos demais reagentes utilizados durante a extração, que permanecem na porção aquosa. Soluções quelantes (EDTA, por exemplo) podem vir a ser utilizadas durante o processo de extração, com o intuito de sequestrar íons essenciais à atividade de desoxirribonucleases (DNAses), visto que estas necessitam do Mg^{2+} como cofator para sua atuação. No entanto, quando em fase de eluição do material, quelantes devem ser evitados, pela possibilidade de posterior inibição de uma enzima envolvida no processo de amplificação do material genético, por exemplo. Finalmente, a eluição ou ressuspensão do material normalmente é realizada com água esterilizada desmineralizada ou, ainda, com solução diluída de tampão (Tris-HCl), no menor volume possível, a fim de maximizar a detecção.

Diferenciados *kits* comerciais de extração estão disponíveis atualmente para a utilização, os quais variam quanto ao método, ao custo, e ao tempo necessário para a extração. Essa variabilidade permite a flexibilidade na escolha do *kit* que melhor se adeque às necessidades específicas do laboratório. *Kits* de extração manual costumam utilizar agentes não corrosivos, tornando-os seguros para uso. O ideal é que se obtenha elevado grau de reprodutibilidade, em menor tempo, ao processar grande número de amostras. A maioria dos *kits* utiliza o princípio da elevada afinidade entre os ácidos nucleicos com sílica sob condições definidas (providas pelo tampão utilizado). A extração é, na maioria das vezes, realizada com a utilização de colunas de purificação ou a partir de esferas magnéticas revestidas com sílica que absorvem o material genético e não permitem a ligação dos demais elementos celulares. Posteriormente, a utilização de tampões específicos promove a lavagem e eluição do material de interesse. As vantagens da utilização de tais métodos se baseiam na elevada e rápida capacidade de remoção de quaisquer possíveis inibidores da amplificação por PCR (Tang *et al.*, 2005). Dentre as metodologias comerciais utilizadas em *kits* de extração, destacam-se: captura de ácidos nucleicos por lã de fibra de vidro, imobilizada em filtro, posteriormente submetidos a centrifugação – utilizados para soro, sangue total, plasma, urina, fezes, fluidos corporais estéreis, amostras do trato respiratório e *swabs* (genitais, dérmica); captura de ácidos nucleicos por membrana de sílica imobilizada em filtro, submetido posteriormente à centrifugação ou condições de vácuo – espécimes respiratórias, plasma, fezes, soro, sangue total, urina, fluidos corporais estéreis e *swabs* (nasais, anal); isolamento de ácidos nucleicos em fase aquosa, seguido de precipitação com etanol – plasma, sangue total, fezes, trato respiratório, fluidos corporais estéreis, *swabs* (dérmica, anal, genital); dentre outros.

Embora esses *kits* sejam geralmente fáceis de usar, apresentam inconvenientes. O processamento de amostras por métodos manuais requer múltiplas manipulações. Dessa forma, à medida que o número de amostras a ser extraída aumenta, o mesmo acontece com a possibilidade de contaminação devido ao aumento da manipulação. A extração manual é considerada teste de alta complexidade; portanto, deve ser realizada somente por pessoal de laboratório com treinamento adequado. Assim, a fim de garantir a reprodutibilidade dos resultados, um extenso treinamento é necessário. Finalmente, a extração manual é trabalhosa, demorada, e requer atenção do técnico a fim de garantir os melhores resultados.

Além dos exemplos apresentados, existe ainda a possibilidade de procedimantos de extração automatizados. As plataformas de extração, fabricadas por diversas empresas, variam quanto à capacidade e ao custo, e dependem principalmente da quantidade de amostras submetidas à extração. Cientificamente, os métodos de extração são muito parecidos com os aqui descritos, e estão atualmente em uso para amostras

biológicas, tais como: soro, plasma, sangue total, fezes, trato respiratório e *swabs* (cutânea, genital, nasal). Sistemas de extração automatizados apresentam vantagens em relação aos métodos manuais. A extração de ácidos nucleicos a partir de instrumentos automatizados é consistente e reprodutível, com risco mínimo de contaminação cruzada das amostras devido à baixa manipulação. Os procedimentos associados com esses instrumentos poderiam ser potencialmente classificados como de moderada complexidade, não sendo exigida, portanto, a presença de recursos humanos altamente treinados. Finalmente, uma vez que esses sistemas tenham sido validados e que seus procedimentos de manutenção estejam adequados, o monitoramento de controle de qualidade pode vir a ser menos intensivo do que o necessário para extração manual. A desvantagem dos sitemas automáticos de extração residem principalmente na questão econômica. Se há necessidade de extração de grande quantidade de amostras (50 a 100 por dia), certamente o padrão de qualidade superior obtido por processo automatizado justificaria o investimento de capital necessário para esses instrumentos. No entanto, além do custo do equipamento, custos marginais, como necessidade de materiais descartáveis específicos também devem ser considerados. Alternativamente, modelos menores de plataformas automáticas de extração estão surgindo no mercado e, embora esses instrumentos extraiam um número significativamente menor de amostras ao mesmo tempo, eles são economicamente mais viáveis.

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida há aproximadamente vinte anos (Saiki *et al*., 1988), e é considerada um dos maiores avanços do diagnóstico molecular, pois permite rápida amplificação do material genético. No PCR, o DNA ou cDNA (DNA complementar, proveniente de uma transcrição reversa de RNA) é amplificado em um termociclador, que realiza um controle de temperatura que permita a repetição, em ciclos, dos três passos principais da reação: 1) desnaturação do DNA molde em fitas únicas de DNA; 2) hibridização dos oligonucleótidos iniciadores (*primers*) em locais do DNA onde ocorra uma complementaridade de bases; 3) extensão, a partir dos *primers*, de novas fitas de DNA complementares àquelas aneladas pelos *primers*, através da utilização de uma enzima capaz de sintetizar uma nova fita de DNA (DNA polimerase) na presença de determinados substratos (nucleotídios, Mg, e condições de reação específicas fornecidas pelo tampão da enzima). Dessa forma, existe a capacidade de síntese *in vitro* do gene de interesse (Yang *et al*., 2004). O ensaio de PCR é capaz de detectar rapidamente e de forma precisa a presença do DNA de microrganismos específicos diretamente de amostras clínicas (mesmo em baixo número de cópias), incluindo os fastidiosos, incapazes de serem cultivados ou de crescimento lento. Além disso, a técnica é ainda capaz de identificar questões mais pontuais, como detectar genes específicos envolvidos em resistência a antimicrobianos.

- **Seleção do alvo e desenho de *primers*:** as sequências de *primers* desenhados objetivando a amplificação correta do alvo devem ser únicas, a fim de identificar um organismo específico (espécie) ou um grupo de organismos (gênero), quantificar o microrganismo (frequentemente utilizado para vírus), ou identificar a características de virulência e/ou genes, ou genes ou mutações associadas à resistência a antimicrobianos. De maneira geral, a síntese desses oligonucleotídeos iniciadores ocorre a partir da disponibilidade do genoma em questão, o qual será utilizado como base para, primeiramente, a identificação do gene-alvo e/ou região específica do DNA que se deseja amplificar (preferencialmente evitando-se locais com uma frequência significativa de polimorfismos); e, num segundo momento da identificação de sequências flanqueadoras específicas, que permitam uma hibridização correta no local de interesse. Os *primers* apresentam grande importância nesse tipo de ensaio, pois são os principais responsáveis para o nível de especificidade do ensaio de PCR. A pesquisa do genoma de interesse pode ser realizada em bancos de dados públicos de DNA na internet, como o GenBank, disponibilizado pelo Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI). Dessa maneira, além de verificar a possibilidade de anelamento em regiões inespecíficas do próprio genoma-alvo, torna-se também possível evitar uma possível reatividade cruzada que possa ocorrer com a matriz de amostra utilizada no teste, quase sempre matrizes complexas (extração não oriunda de crescimento microbiano puro), contando com a presença de demais microrganismos (comensais ou não), bem como da própria matriz celular do hospedeiro. Além disso, determinados fatores são características específicas de bons *primers*, por exemplo: tamanho entre 15 e 30 nucleotídios; conteúdo de G+C entre 40% e 60%; pares de *primers* com temperatura de melting (Tm) similares; sequências com baixo potencial para formar estruturas secundárias (hibridização cruzada com demais nucleotídios da reação); evitar sequências que formem dímeros de *primers* (hibridização entre os oligonucleotídeos).
- **Componentes básicos:** de forma simplificada, os seguintes componentes são essenciais para que se realize uma reação de PCR:

DNA-polimerase termoestável: o isolamento de uma enzima capaz de catalisar a síntese de DNA sob altas temperaturas levou à possibilidade do desenvolvimento da reação de PCR. Especificamente, a DNA polimerase de *Termus aquaticus* (posteriormente denominada *Taq* polimerase) apresenta uma atividade ótima a 75 °C, pH 9.00, sendo altamente utilizada em diagnósticos clínicos que envolvam a tecnologia de PCR. Para tanto, essa enzima tem sua atividade frequentemente classificada em Unidades Internacionais, onde 1 UI desta é definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a incorporação de 10 nmol de nucleotídeos (dNTP) em um tempo de reação de 30 minutos, sob condições ótimas de atividade enzimática.

DNA molde: a quantidade de DNA a ser testada na reação de PCR é critério de extrema importância, pois seu excesso pode inibir a atividade da enzima. Aconselha-se iniciar a padronização de uma reação de PCR com uma concentração de DNA menor ou igual a 10 ng/μL.

Oligonucleotídeos iniciadores ou *primers*: como foi descrito, devem ser complementares à sequência-alvo, flanqueando o segmento de DNA a ser amplificado, e apresentando orientações opostas, de forma a cada um dos *primers* anelar com cada uma das dupla-fitas do DNA molde.

Substratos: desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs, incluindo quantidades equimolares de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), tampão de reação para DNA polimerase (contendo tampões para controle do pH e cofatores enzimáticos, como magnésio, principalmente) e água esterilizada e deionizada.

A reação de PCR se resume em três etapas principais:

- Desnaturação: abertura de fitas de DNA molde para que *primers* tenham acesso ao local de hibridização - 95 °C.
- Hibridização/anelamento: nessa etapa, a Tm calculada anteriormente para o par de *primers* indica a temperatura a ser utilizada, proveniente do seguinte cálculo: Tm - 20 °C. É o momento em que os *primers* anelam ao DNA de acordo com a complementaridade das sequências. Normalmente, a temperatura de anelamento está entre 40 °C e 60 °C. O aumento de uma temperatura de anelamento aumenta a especificidade da hibridização, e pode ser utilizada como foco de modificação durante a otimização da reação visando à maior especificidade. O tempo utilizado varia entre 30 segundos e 1 minuto.
- Extensão: a terceira etapa corresponde ao momento de síntese do DNA propriamente dito, onde a polimerase identifica os *primers* anelados ao DNA-alvo, utilizando-o como molde para a síntese de uma fita complementar. A temperatura de extensão é de 72 °C (dependente da temperatura ótima de atuação da enzima em questão), sendo que o tempo necessário nessa etapa está diretamente relacionado ao tamanho do *amplicon* desejado, utilizando-se normalmente a regra de 1 minuto por kb de DNA a ser sintetizado.

As três etapas anteriormente descritas são repetidas sequencialmente em ciclos (20 a 40 ciclos), sendo que ao final de cada ciclo há a duplicação do número de moléculas de DNA (fita dupla). Tradicionalmente, utiliza-se um passo inicial de desnaturação (em torno de 10 minutos), seguido dos ciclos e, ao final, um passo final de extensão.

- **Eletroforese em gel de agarose:** a técnica de PCR necessita de uma etapa de pós-amplificação, onde se torne possível a detecção do produto gerado a partir da reação de PCR. A agarose (D-Gal e L-Gal) corresponde a um polímero linear capaz de formar uma matriz (gel) após fundida e resfriada, a qual é utilizada após o experimento de PCR para separar os fragmentos de DNA gerados pela reação. Conhecida como eletrofores em gel de agarose, constitui técnica de moderada sensibilidade, onde os ácidos nucleicos podem ser visualizados no gel, através de corantes específicos que se intercalam às bases nitrogenadas do DNA/RNA. O Brometo de Etídeo (BrEt), por exemplo, tem sido historicamente utilizado para este fim. Quando ligado aos ácidos nucleicos, a fluorescência do BrEt é maior do que quando livre em solução, permitindo a detecção de pequenas quantidades de material genético (em torno de 10 ng DNA/RNA) através de uma coloração laranja após sua excitação com radiação ultravioleta. No entanto, um dos principais problemas quanto ao uso do BrEt reside no fato de ser uma substância altamente mutagênica, carcinogênica e teratogênica, o que limita sua utilização a locais com biossegurança estritamente controlada, bem como manipulado somente por recursos humanos altamente treinados. Visando a eliminar a periculosidade desse ensaio, atualmente diversos corantes alternativos estão disponíveis no mercado, apresentando sensibilidade de detecção de ácidos nucleicos similares. Determinados fatores podem influenciar a migração do gel de agarose, a saber: o tamanho dos fragmentos de DNA, a conformação do DNA, a corrente aplicada e a direção do campo elétrico na cuba eletroforética (DNA migra em direção ao ânodo-carga positiva), e a composição do tampão de eletroforese (força iônica e pH do tampão).
- **Variações da PCR:** de acordo com o objetivo traçado, a reação de PCR pode sofrer determinadas variações. A utilização da PCR Multiplex, por exemplo, fornece a possibilidade da amplificação de uma quantidade maior de alvos, utilizando-se somente uma reação. Resumidamente, *primers* para vários alvos diferentes são adicionados à mesma reação, e os fragmentos são posteriormente analisados para a identificação do gene específico. Obviamente, caso esse tipo de identificação seja realizado através da migração em gel de eletroforese, cada *amplicon* diferenciado deve ter um peso molecular específico, que possa posteriormente ser separado e identificado no gel de eletroforese. Um dos maiores problemas com esse tipo de técnica reside na necessidade de um desenho de *primers* muito bem-feito e de uma otimização de reação bem-delineada, visto que todos os problemas descritos anteriormente relativos à possibilidade de resultados alternativos na reação em decorrência de *primers* pouco otimizados aumentam à medida que aumenta o número de oligonucleotídeos em uma mesma reação.

No laboratório de microbiologia clínica, frequentemente são utilizados *kits* diagnósticos que se utilizam de alterações da técnica de PCR, adicionando características específicas de acordo com o evento em questão. Resumidamente, as seguintes técnicas foram adaptadas como ensaios comerciais:

Nucleic Acid Sequence Based Amplification (Nasba) (Compton, 1991)

Essa metodologia é utilizada quando se necessita proceder à amplificação a partir de sequências de RNA, sendo

uma metodologia utilizada para diagnóstico e quantificação de microrganismos que apresentem genomas contendo RNA apenas, como os genomas virais de HIV e Influenza A, por exemplo. A seguinte metodologia é realizada: a amostra de RNA é anelada com um dos *primers* complementares (correspondente ao anelante de região 3'), e uma transcriptase reversa é utilizada para a síntese da fita complementar; a seguir, utiliza-se uma enzima RNAse H, cuja ação consiste em eliminar o RNA quando anelado a uma fita de DNA (porém incapaz de clivar RNA de fita simples), o que elimina a fita-molde anelada ao cDNA formado. Dessa maneira, o cDNA é submetido à presença do segundo *primer* do par (anelante da porção 5'), e a utilização novamente de uma transcriptase reversa possibilita a síntese da fita complementar do cDNA. Além disso, a técnica envolve ainda a utilização de uma T7 RNA polimerase, que fornece amplificação contínua do RNA molde da amostra, fornecendo substrato para as demais reações descritas acima. Nasba utiliza uma reação isotérmica (temperatura constante de 41 °C), sendo esta a principal diferença para as demais reações de transcriptase reversa utilizadas na biologia molecular.

Ligase Chain Reaction (LCR) (Barany, 1991)

LCR consiste de uma técnica de amplificação de DNA, que utiliza um par de *primers* para cada fita (líder a reversa) de DNA a ser amplificado, resultando na amplificação em cada fita molde de fragmentos posteriormente utilizados para o ciclo seguinte de amplificação. Isso torna-se possível pela atuação de uma DNA ligase, que liga os fragmentos sintetizados em uma mesma fita. Isso aumenta o número de *amplicons* molde para a reação seguinte em um número menor de ciclos, se comparada com a PCR comum, o que garante uma especificidade maior aos testes.

Transcription-Mediated Amplification (TMA) (Gill *et al.*, 2008)

A tecnologia TMA envolve a utilização de uma RNA polimerase e de uma transcriptase reversa com a finalidade de produção de um *amplicon* de RNA, não importando se o molde utilizado corresponda a um genoma de DNA ou RNA. TMA apresenta determinadas diferenças em relação a PCR e LCR. TMA é isotérmica (não há necessidade de uso de termociclador), envolve a síntese de um *amplicon* de RNA (ao invés de DNA, o que reduz a possibilidade de contaminação), e produz em torno de 100 -1.000 cópias por ciclo (enquanto PCR produz apenas duas cópias por ciclo, por exemplo).

Strand Displacement Amplification (SDA) (Walker *et al.*, 1992)

SDA corresponde a uma técnica bastante utilizada no diagnóstico de microbiologia clínica: é uma reação isotérmica (após desnaturação inicial da fita de DNA), onde inicialmente o DNA-alvo necessita ser marcado, através da quebra pela atuação de enzimas de restrição, obedecendo a um sítio de restrição específico, que serve de *primer* para o início da reação. Posteriormente, se utiliza uma DNA polimerase com atividade de síntese 5' a 3', porém sem a capacidade de exonuclease 5' a 3', e que permite um deslocamento do DNA de fita reversa, como a *Bst* DNA polimerase, por exemplo.

PCR TEMPO REAL

O PCR em tempo real consiste de uma metodologia de amplificação de material genético que permite uma análise quantitativa, bem como fornece um resultado muito mais rapidamente quando comparado ao PCR convencional. Esse método de teste de PCR combina a química de reação descrita anteriormente, com a vantagem da utilização de compostos fluorescentes marcando os produtos de reação, e de aparelho capaz de realizar a detecção de produtos amplificados. Isso elimina uma das etapas mais trabalhosas e demoradas do processo de diagnóstico por PCR, que seria a etapa de identificação dos *amplicons* através da eletroforese em gel de agarose. Após a otimização da reação, a quantidade de produto formada pode ser acompanhada passo a passo devido à quantificação da fluorescência (diretamente relacionada à presença de produto de reação) e acompanhada durante a ciclagem da reação de PCR. Além disso, os programas utilizados por termocicladores desse tipo permitem um programa de ciclagem rápido, com a possibilidade de liberação de resultado final em torno de uma a duas horas. Assim como a rapidez do resultado, a técnica de PCR tempo real oferece ainda excelente sensibilidade, especificidade e baixo risco de contaminação, visto que a análise é realizada em plataforma fechada, exigindo menor grau de manipulação. Devido à sua simplicidade, especificidade, sensibilidade e rapidez, a utilização de PCR em tempo real na microbiologia clínica está se expandindo rapidamente. Atualmente, diversos *kits* diagnósticos estão disponíveis e se utilizam dessa tecnologia para a identificação de microrganismos relacionados a processos infecciosos.

Em geral, existem dois métodos de detecção de amplificação em PCR em tempo real, ambos se utilizando de fluoróforos como marcadores do produto final.

- **SYBR *Green*:** o primeiro método a ser descrito corresponde ao mais simples, com a utilização de um fluoróforo capaz de se ligar especificamente em ácido nucleico de cadeia dupla, como o SYBR Green, por exemplo. O nome utilizado pode variar de acordo com o fornecedor, porém todos eles possuem a mesma característica de ação. Esse tipo de fluoróforo apresenta a vantagem de ser um marcador fácil de ser utilizado, que pode ser adicionado em reações de PCR bastante similares àquelas descritas anteriormente, apenas com a adição do SYBR Green ao protocolo de reação. Assim, não há necessidade de desenho de pares de sondas específicas para esse procedimento. SYBR fornece uma detecção com alta sensibilidade, porém sua especificidade pode vir a ser um problema. O fluoróforo irá se ligar sempre que houver uma dupla fita de DNA presente na amostra, e

sua fluorescência será verificada pelo aparelho. Assim, um dos cuidados que se deve ter, primeiramente, corresponde à concentração inicial de DNA presente na reação, pois como corresponde a DNA dupla fita, isso será ligado pelo fluoróforo e identificado pelo aparelho. Tipicamente, em uma reação de PCR positiva se observa um período inicial sem alteração na fluorescência (correspondendo apenas ao DNA inserido na reação), seguido por uma curva logarítmica (indicando a positividade da reação devido ao aumento logarítmico das moléculas de DNA com a ciclagem do PCR) até se chegar a um platô (relacionado ao estado de equilíbrio da reação enzimática). Após o final da ciclagem da reação de PCR, existe a possibilidade de se determinar a temperatura de fusão dos *amplicons* gerados. Esse experimento é denominado curva de Melting, e tem como objetivo determinar a Tm (temperatura onde metade das moléculas estão em fita dupla), o que permite diferenciar os produtos de PCR de acordo com o seu conteúdo de G+C. Amplicons diferentes irão apresentar Tm diferenciadas. Oriunda dessa metodologia, uma segunda técnica tem sido bastante utilizada atualmente: a análise da curva de Melting para identificação de mutações pontuais em determinados genes, ou até mesmo para sorotipagem de determinados microrganismos. Essa técninca, denominada High Resolution Melting, utiliza um fluoróforo que age da mesma maneira que o SYBR, porém com uma sensibilidade muito maior, i.e., liga-se em praticamente toda a fita de DNA do amplicon (ao contrário de apresentar ligação prefenrecial apenas em regiões com maior quantidade CG, como ocorre com o SYBR), o que permite um controle restrito e identificação específica da alteração da temperatura de Melting, tornando possível a identificação de mutações pontuais, por exemplo.

Além do método SYBR, outras metodologias são utilizadas atualmente em procedimentos de PCR tempo real, as quais foram desenvolvidas com o objetivo claro de aumentar a sensibilidade e especificidade do método. Nessa segunda categoria encontra-se a utilização de sondas fluorescentes para a detecção de ácidos nucléicos. Três tipos de métodos têm sido utilizados mais frequentemente em plataformas de tempo real com o objetivo de diagnóstico na microbiologia clínica, denominados sondas TaqMan, Molecular Beacons e sondas FRET.

- **SONDAS TaqMan:** sondas TaqMan foram idealizadas inicialmente para aumentar a especificidade de testes de PCR tempo real. A metodologia do teste utiliza duas características importantes para poder ser realizada: 1) a capacidade exonucleásica 5'-3' da polimerase utilizada na reação de PCR; e 2) o fenômeno de transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET). FRET corresponde ao mecanismo físico de transferência de energia de forma não radiativa entre dois cromóforos, sem a necessidade de reabsorção de radiação eletromagnética, onde um cromóforo em estado eletrônico excitado é capaz de transferir essa energia para um segundo cromóforo. No entanto, a eficiência dessa transferência é possível somente a pequenas distâncias (1 a 10 nm entre os cromóforos). Ao contrário do verificado para a metodologia SYBR, nesse caso é necessária a confecção de uma sonda além do par de *primers*. A sonda deve ser localizada entre os *primers*, e irá conter um fluoróforo (em sua extremidade 5') e um *quencher* (na extremidade 3'). O objetivo do *quencher* nesse caso é o de limitar a fluorescência emitida pelo fluoróforo sem que haja alguma amplificação do DNA em questão. Dessa maneira, estando ambos, fluoróforo e *quencher,* próximos um do outro (i.e., no estado sintetizado da sonda) nenhuma fluorescência é observada. Após o anelamento dos *primers* e das sondas, a DNA polimerase inicia o processo de síntese do DNA e remove a sonda devido à sua capacidade de exonuclease; com isso, o fluoróforo é liberado e pode ser detectado, visto que o efeito do *quencher* sobre ele não é mais observado. Dessa forma, a quantidade de fluoróforo liberado é diretamente proporcional à do *amplicon* presente na amostra. Diferenciados fluoróforos (FAM, TET, etc.) e *quenchers* (TAMRA, MGB etc.) podem ser utilizados para a confecção dessas sondas, os quais devem ser escolhidos de acordo com o comprimento de onda que se deseje trabalhar. Este é um método de escolha para testes quantitativos por permitir que a fluorescência seja mensurada de maneira cumulativa durante o estágio exponencial da PCR, além de ser um teste altamente específico. Além disso, sondas TaqMan são ainda utilizadas em PCR Multiplex para a identificação de diferenciados alvos em um mesmo ensaio, bastando para isso que se utilizem fluoróforos que não apresentam emissão de luz absorvidas em um mesmo comprimento de onda do espectro ultravioleta (Holland *et al.*, 1991; Ota *et al.*, 1998).
- **Molecular *beacons*:** também se utilizam da tecnologia FRET, porém suas sondas apresentam conformação diferenciada denominada "*hairpin*" pelo anelamento que ocorre entre as porções 5' e 3'. Esse anelamento é rompido ao se atingir temperaturas mais altas durante a ciclagem do PCR. O *hairpin* apresenta normalmente tamanho de 25 nucleotídeos, sendo que os 15 nucleotídeos internos são os responsáveis pelo anelamento à sequência-alvo (DNA ou RNA). As regiões terminais, por outro lado, possuem o objetivo de serem complementares para que se forme a estrutura secundária de *hairpin*. Ainda, nessas proximidades, são inseridos o fluoróforo (porção 5') e *quencher* (porção 3'); portanto, quando na conformação *hairpin*, favorece com que a tecnologia FRET seja colocada em prática. Por outro lado, uma vez que a sonda é denaturada e anelada ao DNA, permite a emissão de fluorescência por parte do fluoróforo (Tyagi *et al.*, 1996).
- **Sondas FRET:** sondas FRET também conhecidas como sondas LightCycler. Sondas FRET correspondem a um par de sondas a serem hibridizadas em locais

bastante próximos, sendo que em cada uma delas estará anexado um fluoróforo diferente. Se ambas as sondas conseguirem hibridizar a região-alvo, a fluorescência do fluoróforo de uma das sondas é absorvida pelo fluoróforo adjacente, presente na sonda seguinte, o qual é também excitado e emite luz a um terceiro comprimento de onda, o qual é detectado. Se não houver DNA-alvo na amostra, não ocorrerá o alinhamento das sondas, e o fenômeno não será observado, pois os fluoróforos estão distantes entre eles. As duas sondas abrangem uma região de mais de 40 a 50 bases, concebidas para emparelhar uma ao lado da outra, proporcionando excelente especificidade. Esta característica de sondas de hibridação FRET é vantajosa nos casos em que o genoma do organismo-alvo é conhecido por mutar com frequência, como o verificado em diagnósticos envolvendo vírus (Didenko, 2001).

SEQUENCIAMENTO DE DNA

O sequenciamento é um método poderoso para identificação de culturas clínicas, e está se tornando uma metodologia acessível com a introdução de novas tecnologias. Além da possibilidade de sua atuação no diagnóstico direto, o sequenciamento é também importante para o desenvolvimento de outros procedimentos diagnósticos de microrganismos. O sucesso de qualquer dos testes moleculares para diagnóstico de doenças infecciosas depende da seleção de espécies bacterianas e/ou de regiões de interesse específicas de agentes patogênicos, como determinantes de resistência aos antimicrobianos, genes codificantes de toxinas etc., de forma que se possam caracterizar alvos específicos para o desenvolvimento de testes moleculares sensíveis e específicos.

O projeto inicial de sequenciamento de um genoma completo, que utilizava a técnica clássica de Sanger, levou vários anos e centenas de milhares de dólares para ser finalizado. Ao longo dos últimos vinte anos, no entanto, a tecnologia envolvida no sequenciamento de DNA avançou muito, gerando quantidades enormes de informação e sequências completas de genomas de diversos microrganismos (Joseph *et al.*, 2010). Nos bancos de dados de genomas é possível encontrar atualmente pelo menos um genoma completo disponível para quase todos os patógenos bacterianos humanos. O advento das tecnologias de sequenciamento de última geração, introduzidas em 2004, tornaram o processo muito mais rápido, onde um genoma bacteriano patógeno (1 a 6 Mb) pode ser sequenciado em menos de um dia, além de ter custo de sequenciamento reduzido drasticamente. Esse grupo de tecnologias (por exemplo, Roche 454, Illumina, entre outros) aumentou a eficiência do processo, permitindo o sequenciamento de centenas de milhares a milhões de moldes de DNA aleatórios na mesma reação (Shendure, 2008). Dessa forma, o cenário atual é de uma nova era de genômica comparativa, utilizando dezenas de sequências, de diferenciadas linhagens, com a utilização de ferramentas da bioinformática que permitem a identificação de assinaturas de DNA que possibilitam a seleção de regiões exclusivas para espécies e gêneros bacterianos (Beres *et al.*, 2010).

Uma das estratégias no diagnóstico molecular de infecções bacterianas é a amplificação do gene responsável pela síntesese da porção ribossomal 16S (*16SrRNA*). Esse gene está, logicamente, presente em todas as bactérias, sendo que as mutações ocorrem ao acaso e não estão, em geral, sujeitas a forças seletivas. Apesar disso, é importante verificar que o *16SrRNA* contém muitos domínios, alguns dos quais são conservados e outros são variáveis. Muitas vezes, a amplificação e o sequenciamento parcial do *16SrRNA* é suficiente para identificar as bactérias. No entanto, algumas espécies dentro de um mesmo gênero podem apresentar sequências de *16SrRNA* quase idênticas, porém apenas 35% de identidade de sequência de maneira geral. Isso representa um problema para identificação bacteriana, uma vez que todo o restante do genoma seria bastante diferenciado, podendo ancorar diferenciados genes de patogenicidade e/ou resistência a antimicrobianos, por exemplo. Dessa maneira, o sequenciamento de *16SrRNA* atualmente está mais relacionado à pesquisa do que a sua utilização em procedimentos diagnósticos (Clarridge, 2004; Patel, 2001). A tendência atual para esse tipo de experimento é a de utilizar o sequenciamento de isolados clínicos logo após seu isolamento, com o objetivo de comparar genoma com biblioteca de sequências de mesmo microrganismo para identificacão de novas mutações que expliquem fenótipos alternativos como maior invasividade ou resistência a antimicrobianos. Além disso, existe ainda o interesse da utilização do sequenciamento completo de genomas para associação a outros experimentos, focados na tipagem molecular com o intuito de se obter dados de controle epidemiológico, principalmente quando este não é possível por outras técnicas como PFGE, MLST ou MLVA (ver adiante).

EXPERIMENTOS DE HIBRIDIZAÇÃO

Hibridização de fluorescência *in situ* (*fluorescence in situ hybridization* - FISH) corresponde a uma técnica que tem por objetivo identificar sequências específicas de DNA, com a utilização de sondas fluorescentes que hibridizam especificamente regiões de alta complementaridade de sequência. FISH é utilizado não somente em técnicas diagnósticas em microbiologia, mas para diversas técnicas de citogenética em diversos campos da ciência, podendo identificar, além de DNA, regiões específicas de RNA ou, ainda, de peptídeos. Metodologicamente, a técnica necessita primeiramente que uma sonda seja construída, a qual deve ter tamanho suficiente para hibridizar especificamente o alvo (região de DNA desejada). O tamanho da sonda é de extrema importância, visto que sondas grandes possuem menor especificidade de hibridização; usualmente, sondas de 10 a 25 nucleotídeos são utilizadas. O poder discriminatório da sonda irá depender ainda da frequência com que os fragmentos-alvo são identificados no genoma; assim, frequentemente se utilizam regiões que hibridizam regiões codificantes de porções ribossomais. A sonda é ligada a fluoróforos, que deve ser alvo para atuação

de anticorpos ou estreptavidina/biotina, por exemplo. Em determinados experimentos ou *kits* diagnósticos específicos, a fluorescência emitida pode requerer a utilização de um microscópio confocal para sua visualização.

FISH é um método rápido para a visualização e identificação de bactérias diretamente em amostras de interesse, e é capaz de identificar espécies não cultiváveis. Na microbiologia clínica, lìquidos biológicos são submetidos à hibridização com sondas comerciais para a identificação dos microrganismos. Grande quantidade de *kits* aprovados para uso baseia-se na na metodologia FISH, sendo que as sondas utilizadas hibridizam, na maioria das vezes, na região ribossomal 16S. A sua utilização no diagnóstico de bacteremias, por exemplo, permite um diagnóstico de forma mais rápida e confiável, quando em comparação com o método de cultivo convencional. As vantagens da técnica como ferramenta de diagnóstico se baseiam na sua simplicidade, associadas à alta sensibilidade, especificidade e rapidez do processo; por outro lado, a principal limitação da técnica está no estabelecimento de controles de reação robustos e no uso de pessoal qualificado para evitar a hibridização inespecífica (Amann *et al.*, 2008; Moter, 2000; Wagner *et al.*, 2003).

DNA *MICROARRAYS*

Os recentes avanços nas técnincas de análise molecular podem ser verificados no desenvolvimento de DNA *microarrays*, também denominados microarranjos de DNA, que não estão ainda totalmente desenvolvidos para diagnóstico bacteriano, mas estão em processo para uso num futuro próximo. Microarranjos de DNA são experimentos que se baseiam também na técnica de hibridização, porém com a possibilidade da identificação de diversos alvos no mesmo ensaio, visto que milhares de sondas podem ser verificadas em um mesmo experimento. Os *chips* utilizados para esta técnica apresentam um arranjo de moléculas de DNA (fragmentos genômicos, cDNAs ou oligonucleotídeos) fixados a uma superfície. A técnica foi desenvolvida com o objetivo de identificar dados de forma quantitativa (expressao gênica) ou qualitativa (diagnóstico) (Schwarz *et al.*, 2010). Dessa maneira, o material em estudo (DNA genômico ou cDNA proveniente de RNA mensageiro) é marcado com fluoróforos e incubado com a matriz (ou *chip*), favorecendo o processo de hibridização da amostra às sondas complementares imobilizadas. Posteriormente, leitores automatizados são capazes de identificar a presença e/ou ausência do alvo em pesquisa, bem como quantificá-lo através da intensidade do sinal (Cassone *et al.*, 2007). O aumento logarítmico do número de sequências de DNA de patógenos microbianos atualmente disponível, juntamente com o desenvolvimento das tecnologias de imobilização de alto número de dados em pequenas superfícies, favorece o desenvolvimento de testes de alta sensibilidade para uso na microbiologia clínica, que poderiam ter como objetivo a detecção de microrganismos, genotipagem, análises comparativas entre espécies e interespécies, e determinação de resistência a antimicrobianos. Associado a isso, diversos softwares que auxiliam na escolha de sondas corretas para caracterização de diferenciados gêneros e espécies têm sido disponibilizados, o que também favorece o desenvolvimento de testes diagnósticos (MAQC Consortium, 2006). No entanto, existem obstáculos à implementação de microarranjos na microbiologia clínica, dentre eles o principal seria o custo elevado do procedimento, principalmente relacionado à síntese dos *chips* e necessidade de leitores automatizados (Barken *et al.*, 2007).

TIPAGEM MOLECULAR

Os métodos de tipagem são utilizados para a caracterização dos microrganismos, bem como para determinar e controlar sua proliferação entre os indivíduos, principalmente em estudos epidemiológicos. A investigação de surtos de doenças infecciosas tem como objetivo definir as relações genéticas entre as linhagens isoladas de indivíduos hospitalizados, ou que trabalhem dentro de uma área restrita, e dentro de um curto período de tempo (dias, semanas). Outros estudos podem ainda utilizar dados provenientes da tipagem molecular, como no caso da vigilância epidemiológica de longo prazo de doenças infecciosas ou a análise de estrutura populacional (taxonomia), que vise a abordar a relação entre cepas isoladas durante longos períodos de tempo (anos, décadas) em um nível geográfico mais amplo (estados, países, continentes). A tipagem comparativa é aplicada a fim de verificar o número de clones envolvidos na transmissão e infecção, a monitorização dos reservatórios de clones epidemiológicos, bem como para avaliação da eficácia de medidas de controle. Os avanços na biologia molecular conduziram ao desenvolvimento de várias estratégias de tipagem baseadas no DNA.

- ***Restriction fragment length polymorphism* (RFLP):** técnica que envolve a digestão de restrição dos produtos de PCR, a partir de endonuclease(s) de restrição específica(s) para o DNA em questão, com posterior avaliação do comprimento dos fragmentos de DNA verificados (polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição, RFLPs), normalmente através de eletroforese em gel. O poder discriminatório da técnica é moderado, sendo que a resolução pode ser melhorada com o aumento do número de *loci* analisados, ou pelo aumento do número de enzimas de restrição por loco analisadas (Calderwood *et al.*, 1996).
- ***Repetitive Sequence-based PCR* (REP-PCR):** método de análise genômica através da PCR de sequências cromossômicas repetitivas. Sequências repetitivas extragênicas curtas (também denominadas sequências intercaladas repetitivas) estão espalhadas por todo o genoma bacteriano, e podem servir como alvo para a amplificação de DNA genômico, principalmente as sequências repetitivas palindrômicas (Woods *et al.*, 1992).
- ***Arbitrarily primed PCR* (AP-PCR) ou *Random Amplified Polymorphic* DNA (RAPD):** técnica que se baseia na reação de PCR através de *primers* arbitrários (também conhecida como análise de DNA polimórfico

amplificado ao acaso), i.e., que não possuem alta especificidade para anelamento durante a ciclagem da reação. Os *primers* possuem tamanho curto (10 pb) e são utilizados sob baixo rigor nas condições de amplificação. A técnica se baseia no fato de que a organização genética do genoma bacteriano entre diferentes linhagens é refletido pelo tamanho variável e o número de fragmentos amplificados. No entanto, a reprodutibilidade interlaboratorial dessa técnica é considerada apenas moderada, e diversos *primers* comparativos devem ser utilizados para se obter resultados robustos (Welsh *et al*., 1991).

- ***Amplified fragment length polymorphism* (AFLP):** técnica baseada na análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados. Corresponde a uma técnica altamente sensível para a detecção de polimorfismos de DNA. O DNA extraído é digerido com uma ou mais enzimas de restrição, de modo que posteriormente esses fragmentos possam ser ligados (através da utilização de uma ligase), e posteriormente submetidos à amplificação. Os fragmentos amplificados são separados e visualizados em géis de poliacrilamida desnaturantes (que permitem a separação de tamanhos, fragmentos menores de DNA), ou, ainda, detectados através de fluorescência por metodolgias de eletroforese capilar (procedimento automatizado). Os resultados obtidos são classificados como presença/ausência de polimorfismos. A técnica é bastante utilizada para a detecção de polimorfismos em diferenciadas regiões genômicas, simultaneamente, bem como na identificação de variação genética em linhagens microbianas altamente relacionadas, por exemplo. AFLP é considerada uma técnica altamente robusta, apresentando vantagens em comparação às demais (RFLP, RAPD etc.), pois possui maior reprodutibilidade, sensibilidade, poder de resolução, além de ter a capacidade de amplificar entre 50 a 100 fragmentos ao mesmo tempo, em uma única reação. No entanto, é uma técnica laboriosa, que necessita recursos humanos altamente qualificados para se atingir resultados ótimos (Savelkoul *et al*., 1999).
- ***Pulsed field gel eltrophoresis* (PFGE):** o procedimento envolve o crescimento microbiano controlado, com posterior extração do DNA e tratamento deste com enzimas de restrição específicas. As endonucleases de restrição reconhecem determinados locais em genomas bacterianos, produzindo grandes fragmentos de DNA, denominados fragmentos de macrorrestrição. Devido ao tamanho desses fragmentos, é necessária uma metodologia diferenciada de eletroforese, denominada eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Durante o procedimento de PFGE, a orientação do campo elétrico ao longo do gel é modificada periodicamente, e a separação dos fragmentos de DNA baseia-se principalmente no tempo necessário para que suas moléculas se reorientem no gel, em vez da velocidade com que podem migrar em conjunto (como utilizado na eletroforese normal). PFGE é considerado como o "padrão-ouro" atual para a genotipagem de microrganismos (Prevost *et al*., 1992). No entanto, esta técnica gera padrões de bandas complexos, e diretrizes internacionalmente aceitas para a interpretação dos dados foram elaboradas (ver abaixo) visando a otimizar a técnica, uma vez que a reprodutibilidade interlaboratorial do método é moderada (Murchan *et al*., 2003).
- ***Multilocus Sequence Typing* (MLST):** a técnica de MLST é baseada na amplificação e posterior sequenciamento de regiões conservadas do DNA-alvo para a verificação de variações de sequência e identificação de perfis alélicos específicos, e é atualmente uma das metodologias de tipagem mais utilizadas para a caracterização bacteriana, principalmente intraespécies. A técnica é robusta, se utiliza da comparação de sequências de DNA, e é considerado o método mais rigoroso para definição de similaridades entre linhagens bacterianas (Maiden *et al*., 2006). Primeiramente, uma seleção criteriosa dos alvos deve ser relizada: os alvos devem ser 5 a 10 genes conservados (depende da estringência requerida para o teste) e constitutivos, i.e., que codificam para proteínas que são essenciais para a viabilidade celular, e que não costumem sofrer mutação com frequência. O tamanho do *amplicon* gerado deve ser de 450 a 500 pb, de forma que o sequenciamento a ser realizado posteriormente possua cobertura total sobre os *amplicons* em questão. Após o sequenciamento, os dados gerados são analisados; a cada fragmento de gene sequenciado são atribuídos números de identificação de alelos distintos, e a combinação dos números definidos para todos os fragmentos do gene gera uma *sequence type* (ST). O MLST especificamente corresponde à análise das STs e à relação da comparação entre esses alelos, onde os isolados com o mesmo perfil alélico podem ser considerados clonalmente relacionados. A técninca de MLST permite a investigação de estruturas populacionais bacterianas e a comparação direta de dados, que são armazenados em bancos de dados específicos e podem ser acessados por diferenciados laboratórios ao redor do mundo (Maiden *et al*., 1998; Enright *et al*., 1999).
- ***Multiple Loci Variable Number Tandem Repeat Analysis* (MLVA):** MLVA corresponde a um método utilizado para a análise de microrganismos específicos, que utiliza o polimorfismo genético verificado nas regiões VNTR (*variable-number tandem repeat*): locais específicos do DNA que apresentam a mesma sequência repetidamente, cujo número de repetição pode ser variável, dependente especificamente do organismo em questão, o que a caracteriza como uma marca específica de cada organismo. VNTRs são importantes fontes de polimorfismo genético para identificação de linhagens estreitamente relacionadas, devido à sua rápida evolução. Metodologicamente, são selecionadas regiões bem caracterizadas (principalmente em relação às taxas de mutação e diversidade gênica), que são posteriormente amplificadas visando à análise do tamanho do *amplicon* gerado, o que normalmente ocorre através da análise de

eletroforese capilar. Para isso são utilizados *primers* que anelam em regiões conservadas flanqueando os alvos, que podem apresentar tamanho modificado de acordo com o número de repetições de uma sequência específica de DNA. Dessa forma, a variabilidade na quantidade de sequências curtas repetidas em *tandem* é usada para criar DNA perfis para genotipagem (Yazdankhah *et al.*, 2007; Rivero-Pérez *et al.*, 2010).

Critérios para a interpretação dos resultados de tipagem molecular

Experimentos de tipagem molecular diferenciam linhagens similares de cepas não relacionadas. No entanto, a interpretação dos dados experimentais é uma etapa complexa e extremamente importante do processo. Os critérios de interpretação desses dados devem obedecer às orientações claras para a determinação inequívoca do nível de variação genética (Tenover *et al.*, 1997). Essencialmente, a maioria das técnicas utilizadas gera imagens de padrões de bandas complexas, onde sua interpretação permanece, de certa forma, especulativa. A desvantagem que ocorre nesse caso é o fato de que a análise das bandas é realizada manualmente, podendo levar a viés subjetivo pelo usuário. Para uma definição mais precisa da similaridade entre linhagens, os resultados obtidos através da tipagem podem ser submetidos à análise computacional, com a utilização de softwares específicos (GelCompar, Philip, Ambis, BioImage, Dendron, Taxotron, Molecular Analyst, BioNumerics, entre outros). No entanto, a possibilidade de edição dos dados obtidos não elimina por completo o viés descrito anteriormente. Atualmente, não existem métodos para resolver esses problemas. Uma possível automação das metodologias de tipagem, apresentando uma normalização completa dos dados (incluindo sua interpretação), poderia vir a solucionar os problemas mencionados.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Novas estratégias para a identificação de microrganismos, que não são baseadas na identificação do material genético, estão em pleno uso no diagnóstico clínico microbiano. A espectrometria de massas, por exemplo, tem sido bastante utilizada na identificação de microrganismos. O procedimento de *matrix-assisted laser desorption-time of flight (MALDI-TOF)* promove a identificação de bactérias a nível de espécies com a necessidade de um inóculo com baixa quantidade de microrganismos. Isolados provenientes de hemoculturas, por exemplo, são plaquadas em ágar sangue e assim que as colônias começam a ser notadas (em torno de 2 a 3 horas) já podem ser submetidas à análise por *MALDI-TOF*. A técnica reduz o risco de identificação errônea de microrganismos. Metodologicamente, o inóculo bacteriano é disponibilizado na placa da análise, e após o tratamento necessário para digestão enzimática e ionização a *laser*, o que fornece um espectro de massas das proteínas presentes no microrganismo. O espectro é comparado com um banco de dados existente para a identificação da espécie em questão, com um tempo operacional aproximado de duas horas para a liberação do resultado. A metodologia, no entanto, apresenta determinadas limitações, baseadas especialmente na porção proteica do espectro utilizada para a identificação. A porção mais utilizada para esse fim corresponde às regiões da porção ribossomal 16S, cuja similaridade entre determinados microrganismos é reconhecida. Dessa forma, *Escherichia coli* e *Shigella,* por exemplo, apresentam espectros similares, assim como *Streptococcus pneumoniae* não pode ser diferenciado de outros membros do grupo *Streptococcus mitis/oralis.*

CONTROLE E GARANTIA DA QUALIDADE

A qualidade dos resultados obtidos deve ser justificada pelo controle de qualidade de laboratório e procedimentos de garantia da qualidade. O controle de qualidade refere-se a um sistema de controle de processo, que fornece dados sobre a integridade e a exatidão do procedimento. A garantia de qualidade envolve um sistema de procedimentos de revisão, realizada por um instituto independente, visando a monitorar o correto funcionamento dos sistemas de controle de qualidade em execução no laboratório de diagnóstico em microbiologia molecular. A robustez dos métodos moleculares depende muito da qualidade dos reagentes e da calibração dos instrumentos utilizados. Esse controle de qualidade deve ser realizado de acordo com o preconizado pelas agências reguladoras. O treinamento dos profissionais envolvidos deve logicamente ser adequado, mas além disso deve-se procurar cada vez mais a introdução de procedimentos automáticos para processamento das amostras, a fim de reduzir manipulação e aumentar a reprodutibilidade e robustez dos ensaios moleculares (Espy *et al.*, 2006). A documentação de validação dos testes realizados deve demonstrar que os testes estão de acordo com os requisitos preconizados. Adicionalmente, o Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) possui um conjunto de diretrizes e orientações para métodos de diagnóstico moleculares, constantemente revisados, e que deve, sugestivamente, ser incorporado à rotina de trabalho.

Além disso, determinados quesitos devem sempre ser verificados para que um teste diagnóstico tenha sua validade comprovada. Os exemplos a seguir são classicamente utilizados para os experimentos de PCR e PCR tempo real, por exemplo, porém devem, na medida do possível, ser utilizados para qualquer método diagnóstico:

- **Controles de reação:** idealmente, amostras de pacientes já identificadas como contendo o ácido nucleico-alvo são usados como controle positivo, mas isso muitas vezes não é prático ou viável. Uma alternativa aceitável seria a utilização de um controle positivo confeccionado a partir de um *pool* de amostras negativas enriquecido com os microrganismos a serem testados, ou mesmo contendo uma amostra representativa do ácido nucleico a ser detectado. Além disso, o controle positivo deve estar a uma concentração próxima do limite inferior de detecção do ensaio, visando caracterizar o correto funcionamento

do teste diagnóstico. A utilização de controles negativos ocorre na maioria dos testes diagnósticos, no entanto nem sempre de maneira correta. O controle muitas vezes descrito como branco, tal como água ou tampão é frequentemente utilizado como um controle negativo. Porém, um controle negativo real corresponde a uma amostra que contenha ácido nucleico, mas que não seja positiva para o teste em questão, e visa a demonstrar que a amplificação, por exemplo, não está ocorrendo, caracterizando, portanto, que não está ocorrendo uma detecção não específica de determinado produto amplificado. A utilização de controles brancos, contudo, também é indicada com o intuito de demonstrar que os reagentes utilizados não estão contaminados.

- **Garantia da qualidade:** após a implementação do teste, é necessário a monitoração contínua do desempenho do ensaio com controle sobre equipamentos, reagentes e pessoal, incluindo controle da taxa de positividade do paciente para todos os ensaios realizados no aparelho de forma semanal ou mensal. O controle da qualidade dos reagentes deve ser realizado diariamente, inclusive dos controles positivos, negativos e de extração. Finalmente, a avaliação do desempenho dos instrumentos deve ser avaliada semestralmente.
- **Contaminação:** a situação mais favorável à contaminação em experimentos moleculares ocorre no proceeso de transferência da amostra para tubo de extração do ácido nucleico ou para o tubo teste de reação, principalmente nos experimentos de amplificação. Cuidados básicos devem ser tomados para evitar a contaminação, como controle durante manipulação de pipetas, evitar a liberação de aerossol, além de sempre tomar cuidados especiais visto que todas as amostras são potenciais carreadoras de elevada concentração de microrganismos. Além disso, o fluxo unidirecional de trabalho deve ser seguido, preferencialmente, com separação espacial de espaços de trabalho para diferenciados processos.

APLICAÇÕES

Atualmente, uma gama de testes diagnósticos está aprovada para uso no laboratório de microbilogia clínica. Testes de PCR tempo real, por exemplo, apresentam vantagens quando comparados às demais técnicas de identificação, tais como: imunoensaios (*swabs* para identificação de *Streptococcus* do grupo A, material fecal para identificação de toxina de *Clostridium difficile* e *Escherichia coli* O157:H7); cultura para identificação de microrganismo específico a partir de uma amostra contendo microbiota endógena (secreção vaginal/anal para identificação de *Streptococcus* do grupo B); microrganismos de cultura difícil ou inviável (*Anaplasma phagocytophila*, *Bartonella henselae*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia* spp., *Legionella* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Tropheryma whipplei*); microrganismos de identificação dificultada (Microbactérias); identificação de marcadores de resistência a antimicrobianos (*Staphylococcus – MRSA*, *Enterococcus – VanR*); identificação e quantificação viral, entre outros.

Além disso, clinicamente o diagnóstico rápido fornecido por técnicas moleculares também é fator importante. Agentes atípicos envolvidos no desenvolvimento de pneumonias, como *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Legionella* spp. são de difícil cultura e seu diagnóstico requer tempo prolongado. Métodos moleculares disponíveis permitem sua identificação mais rapidamente. Agentes microbianos envolvidos no desenvolvimento de meningite bacteriana requerem diagnóstico rápido devido à alta morbi-mortalidade dessas infecções. Testes de PCR em tempo real fornecem resultados muito mais rapidamente do que a cultura, e maior sensibilidade de identificação de microrganismos, tais como: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. Ainda, testes moleculares são vantajosos, pois permitem identificação do microrganismo mesmo que culturas se apresentem negativas, como casos de meningite em processo de tratamento com antimicrobianos.

Tabela 40.1 Principais agentes infecciosos detectados por métodos moleculares.

Agente infeccioso	Metodologia
Bacillus anthracis	PCR tempo real
Candida spp., *C. albicans, C. glabrata,*	Hibridização *in situ* (FISH)
Clostridium difficile	PCR tempo real PCR tempo real Multiplex Hibridização *in situ* (FISH)
Coxiella burnetii	PCR tempo real
Chlamydia trachomatis	PCR, SDA Captura híbrida Hibridização proteica

(*Continua*)

Tabela 40.1 Principais agentes infecciosos detectados por métodos moleculares. (*Continuação*)

Agente infeccioso	Metodologia
Neisseria gonorrhoeae	PCR, SDA, TMA Captura híbrida Hibridização proteica
Chlamydia trachomatis e Neisseria gonorrhoeae	PCR, SDA, TMA PCR tempo real PCR tempo real Multiplex Captura híbrida Hibridização proteica
Enterococcus faecalis	FISH
Escherichia coli e Pseudomonas aeruginosa	FISH
Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae e Pseudomonas aeruginosa	FISH
Francisella tularensis	PCR tempo real
Gardnerella, Trichomonas vaginalis e *Candida* spp.	Hibridização
Streptococcus Grupo A	Hibridização proteica
Streptococcus Grupo B	Hibridização proteica FISH PCR tempo real
Leishmania	PCR tempo real
Staphylococcus aureus	PCR tempo real FISH NASBA
Mycobacterium tuberculosis	Hibridização proteica
Yersinia pestis	PCR tempo real
Adenovirus	PCR tempo real PCR tempo real Multiplex
Influenza H1N1, Influenza A/H5	PCR tempo real
Cytomegalovirus	Captura híbrida NASBA
Enterovírus	PCR tempo real NASBA
Hepatite B (HBV) – quantificação	PCR tempo real
Hepatite C (HCV) – detecção e quantificação	PCR tempo real TMA
HIV – detecção e quantificação	Sequenciamento PCR tempo real

(*Continua*)

Tabela 40.1 Principais agentes infecciosos detectados por métodos moleculares. (*Continuação*)

Agente infeccioso	Metodologia
HBV, HCV e HIV	PCR, TMA PCR tempo real PCR tempo real Multiplex Hibridização
Herpes Simplex (tipos 1 e 2)	PCR, SDA PCR tempo real
HPV	PCR, TMA PCR tempo real PCR tempo real Multiplex

Fonte: Emmadi *et al.*, 2011.

A Tabela 40.1 apresenta uma lista de testes diagnósticos *in vitro* aprovados para uso nos Estados Unidos da América pela autoridade sanitária local, o Food and Drug Administration (FDA), juntamente com a Association for Molecular Pathology, e tem como objetivo ilustrar a ampla variedade de testes disponíveis atualmente para o rápido diagnóstico de microrganismos (Emmadi *et al.*, 2011). É importante ressaltar que essa tabela tem como objetivo apenas listar, a título de exemplificação, os testes diagnósticos disponíveis atualmente. Informações complementares, bem como possíveis atualizações podem ser encontradas no website da FDA: www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances.

A detecção de microrganismos envolvidos em processos infecciosos através da utilização de testes diagnósticos moleculares está em um estágio inicial de implementação, e muitos laboratórios ainda utilizam somente os métodos de cultura tradicionais. Os novos princípios baseados na detecção de ácidos nucleicos permitem formas mais rápidas, sensíveis e específicas de monitoramento de bactérias patogênicas, e sua implementação deve aumentar em um futuro próximo.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Amann R, Fuchs BM. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. Nat Rev Microbiol. 2008 May;6(5):339-48.
2. Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jan 1;88(1):189-93.
3. Barken KB, Haagensen JA, Tolker-Nielsen T. Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections. Clin Chim Acta. 2007 Sep;384(1-2):1-11.
4. Beres SB, Carroll RK, Shea PR, et al. Molecular complexity of successive bacterial epidemics deconvoluted by comparative pathogenomics. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Mar 2;107(9):4371-6.
5. Calderwood SB, Baker MA, Carroll PA, et al. Use of cleaved amplified polymorphic sequences to distinguish strains of Staphylococcus epidermidis. J Clin Microbiol. 1996 Nov;34(11):2860-5.
6. Cassone M, Giordano A, Pozzi G. Bacterial DNA microarrays for clinical microbiology: the early logarithmic phase. Front Biosci. 2007 Jan 1;12:2658-69.
7. Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 2004 Oct;17(4):840-62.
8. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. Nature. 1991 Mar 7;350(6313):91-2.
9. Didenko VV. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. Biotechniques. 2001 Nov;31(5):1106-16, 1118, 1120-1.
10. Emmadi R, Boonyaratanakornkit JB, Selvarangan R, et al. Molecular methods and platforms for infectious diseases testing a review of FDA-approved and cleared assays. J Mol Diagn. 2011 Nov;13(6):583-604.
11. Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. Trends Microbiol. 1999 Dec;7(12):482-7.
12. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clin Microbiol Rev. 2006 Jan;19(1):165-256.
13. Fleischmann RD, Adams MD, White O, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. Science. 1995 Jul 28;269(5223):496-512.
14. Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2008 Mar;27(3):224-43.
15. Holland PM, Abramson RD, Watson R, et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Aug 5;88(16):7276-80.
16. Joseph SJ, Read TD. Bacterial population genomics and infectious disease diagnostics. Trends Biotechnol. 2010 Dec;28(12):611-8.
17. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within

populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 17;95(6):3140-5.
18. Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. Annu Rev Microbiol. 2006;60:561-88.
19. MAQC Consortium. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. Nat Biotechnol. 2006 Sep;24(9):1151-61.
20. Moter A, Göbel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J Microbiol Methods. 2000 Jul;41(2):85-112.
21. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, et al. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. J Clin Microbiol. 2003 Apr;41(4):1574-85.
22. Ota N, Hirano K, Warashina M, et al. Determination of interactions between structured nucleic acids by fluorescence resonance energy transfer (FRET): selection of target sites for functional nucleic acids. Nucleic Acids Res. 1998 Feb 1;26(3):735-43.
23. Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. Mol Diagn. 2001 Dec;6(4):313-21.
24. Prevost G, Jaulhac B, Piemont Y. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. J Clin Microbiol. 1992 Apr;30(4):967-73.
25. Rivero-Pérez B, Pérez-Roth E, Méndez-Alvarez S. Evaluation of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for typing a polyclonal hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus population in an area where such infections are endemic. J Clin Microbiol. 2010 Aug;48(8):2991-4.
26. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988 Jan 29;239(4839):487-91.
27. Savelkoul PH, Aarts HJ, de Haas J, et al. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. J Clin Microbiol. 1999 Oct;37(10):3083-91.
28. Schwarz R, Joseph B, Gerlach G, et al. Evaluation of one- and two-color gene expression arrays for microbial comparative genome hybridization analyses in routine applications. J Clin Microbiol. 2010 Sep;48(9):3105-10.
29. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. Nat Biotechnol. 2008 Oct;26(10):1135-45.
30. Tang YW, Sefers SE, Li H, et al. Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens. J Clin Microbiol. 2005 Sep;43(9):4830-3.
31. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. Infect Control Hosp Epidemiol. 1997 Jun;18(6):426-39.
32. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nat Biotechnol. 1996 Mar;14(3):303-8.
33. Wagner M, Horn M, Daims H. Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. Curr Opin Microbiol. 2003 Jun;6(3):302-9.
34. Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, et al. Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique. Nucleic Acids Res. 1992 Apr 11;20(7):1691-6.
35. Welsh J, McClelland M. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. Nucleic Acids Res. 1991 Oct 11;19(19):5275-9.
36. Woods CR Jr, Versalovic J, Koeuth T, et al. Analysis of relationships among isolates of Citrobacter diversus by using DNA fingerprints generated by repetitive sequence-based primers in the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1992 Nov;30(11):2921-9.
37. Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. Lancet Infect Dis. 2004 Jun;4(6):337-48.
38. Yazdankhah SP, Lindstedt BA. Variable number tandem repeat typing of bacteria. Methods Mol Biol. 2007;396:395-405.

41

capítulo

Pedro Alves d'Azevedo ▪ Juliana Caierão

Meios de Cultura

O laboratório de microbiologia apresenta algumas peculiaridades em comparação às outras subáreas das análises clínicas. A principal delas é que, ao contrário dos outros setores que manipulam basicamente espécimes clínicos, a microbiologia destina-se a cultivar microrganismos, os quais necessitam de condições ideais para o crescimento. Tais condições incluem: temperatura adequada (oferecida pelas estufas bacteriológicas), tempo (geralmente uma incubação *overnight* é suficiente, mas podem ser necessários vários dias em casos especiais), atmosfera adequada (representada pelo aumento da tensão de CO_2, quando pertinente) e presença de nutrientes, os quais estão disponíveis nos meios de cultura.

Nesse capítulo, descreveremos as diferentes classificações e os componentes básicos dos principais meios de cultura utilizados rotineiramente no laboratório de microbiologia. Não é nosso foco o modo de preparo dos meios de cultura, nem os métodos para controle de qualidade dos mesmos. Nosso objetivo é que o leitor compreenda quais são os princípios que justificam a utilização de cada um dos meios de cultura na rotina dos laboratórios de microbiologia.

Os primeiros relatos da utilização de meios de cultura são o uso de caldos simples, feitos a partir de urina ou extratos de carne, por Louis Pasteur. Posteriormente, Robert Koch entendeu a importância dos meios de cultura sólidos e utilizou batata para realizar o crescimento bacteriano. Antes da utilização do ágar como agente solidificante, foi feita uma tentativa de uso da gelatina. Entretanto, essa tentativa falhou, pois a gelatina apresentava dois pontos fortemente negativos: se liquefazia à temperatura de estufa e era degradada por alguns microrganismos, tais como algumas amostras de *Enterococcus* spp.

A partir de então, e até os dias atuais, o ágar-ágar (ou simplesmente ágar) é a base para os meios de cultura, sendo o agente solidificante mais utilizado. O ágar é um polissacarídeo ramificado obtido das membranas celulares de algumas espécies de algas vermelhas. Ele é composto de dois polissacarídeos de cadeia longa (70% agarose e 30% agaropectina) e suas temperaturas de fusão e solidificação são, respectivamente, 95 °C e 42 °C. Não há função nutritiva para o ágar, ele não é hidrolisado pela maioria das bactérias e é usualmente livre de promotores de crescimento ou de substâncias que retardem o crescimento. Entretanto, pode ser fonte de cálcio e íons orgânicos.

Gema de ovo e soro também podem ser utilizados para solidificar meio de cultura. Esses componentes são normalmente líquidos, mas se tornam sólidos a partir do processo de coagulação que ocorre pelo aquecimento. Exemplos de meios contendo soro incluem Loeffler (para cultivo de *Corynebacterium* spp.) e, com gema de ovo, o Löwenstein-Jensen (para cultivo de *Mycobacterium* spp.).

Além do ágar, que é responsável pela consistência, é necessário que o meio de cultura contenha todos os nutrientes que as bactérias encontram em seus hábitats naturais, quais sejam: água, uma fonte de carbono e energia, fonte de nitrogênio, oligoelementos e alguns fatores de crescimento.

Os meios de cultura podem ser classificados de acordo com vários parâmetros: consistência, componentes nutricionais ou função.

CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM A CONSISTÊNCIA

Meios de cultura líquidos

Esses meios não apresentam agente solidificante (ágar), tendo a consistência de caldo. Aqui, o crescimento bacteriano é evidenciado pela turvação do meio, que é, inicialmente, translúcido. Certas bactérias aeróbias e aquelas que contêm fímbrias (*Vibrio* e *Bacillus*) produzem um fino filme parecido com uma película na superfície dos meios que não sofrem agitação durante o crescimento bacteriano. Algumas vezes, a turbidez inicial pode ser seguida de uma clarificação do meio, devido à autólise, o que é observado, por exemplo, com *Streptococcus pneumoniae*.

Os meios de cultura líquidos são utilizados quando se necessita de um grande inóculo bacteriano. Além disso, é interessante inocular bactérias em meios líquidos para diluir qualquer inibidor do crescimento bacteriano. Esse é, na verdade, o princípio das hemoculturas.

Por fim, o arranjo (cadeia, aos pares, em aglomerado etc.) de um microrganismo pode ser visualizado, a partir da coloração de Gram, com muito mais qualidade a partir de uma cultura líquida, onde os três planos estão disponíveis para que a bactéria possa crescer em qualquer direção.

O principal ponto negativo das culturas líquidas é o fato de as propriedades fenotípicas das bactérias não serem visíveis, o que impossibilita a observação de culturas contaminadas ou culturas mistas.

Meios de cultura semissólidos

São aqueles em que existe um agente solidificante em uma concentração que pode variar entre 0,2% a 0,5%. Com essa concentração, a consistência do meio é intermediária, permitindo o crescimento dos microrganismos em tensões variadas de oxigênio. São também utilizados para observação da capacidade de motilidade das bactérias e como forma de conservar microrganismos. Alguns meios de transporte, como Stuart ou Amies são semissólidos, assim como outros meios utilizados na identificação bioquímica dos microrganismos.

Meios de cultura sólidos

Nesses casos, o agente solidificante está presente em concentrações mais altas (1% a 3,0%). Os meios de cultura sólidos permitem visualizar a presença de contaminação nas culturas ou a ocorrência de culturas mistas. Além disso, permite a visualização de muitas características fenotípicas úteis na identificação bioquímica dos microrganismos, tais como tipo de hemólise em meios específicos, presença de pigmento, diferentes tipos de morfologia colonial, entre outras.

Meios de cultura bifásicos

Algumas vezes, um sistema de cultura compreende tanto uma fase líquida quanto uma fase sólida, no mesmo recipiente. Esses são conhecidos como meios bifásicos. O inóculo é adicionado ao meio líquido e, quando subcultivos precisam ser realizados, a garrafa é simplesmente inclinada para permitir que o líquido flua sobre o meio sólido. Isso evita que as garrafas sejam frequentemente abertas (e potencialmente contaminadas) quando há a necessidade de subcultivos.

CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM OS COMPONENTES NUTRICIONAIS

Os meios podem ser classificados como simples, complexos e sintéticos. Algumas bactérias necessitam de nutrientes extras para o crescimento, as quais são ditas fastidiosas. Meios simples como ágar nutriente podem suportar o crescimento da maioria das bactérias não fastidiosas. Já os meios complexos são assim chamados porque a sua composição exata é difícil de estimar. Por outro lado, os meios sintéticos ou definidos são especialmente preparados para fins de pesquisa e tem a composição de cada componente muito bem definida.

CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM A FUNÇÃO

Meio básico

São aqueles que suportam o crescimento da maioria das bactérias não fastidiosas. Água peptonada, caldo nutriente e ágar nutriente são considerados meios básicos. São utilizados para cultivo primário ou conservação de microrganismos.

Meio enriquecido

São adicionados nutrientes extras em forma de sangue, soro, gema de ovo, entre outros, a um meio básico para que ele se torne enriquecido. São bastante utilizados na rotina dos laboratórios de microbiologia. Exemplos: ágar sangue, ágar chocolate, ágar Loeffler, entre outros. Utilizados para cultivo primário da maioria dos microrganismos.

Meios seletivos

Desenhados em sua composição para inibir bactérias não desejadas ou contaminantes a partir de uma mistura de microrganismos. Várias abordagens podem ser utilizadas para tornar um meio seletivo, tais como utilização de antimicrobianos, corantes, substâncias químicas, alteração de pH ou a combinação desses. Contêm substâncias que inibem o desenvolvimento de determinados grupos de microrganismos, permitindo o crescimento de outros. Exemplo: meios com telurito de potássio (para isolamento de *C. diphtheriae*), ágar SS (isolamento de *Salmonella* e *Shigella*) e ágar MacConkey (isolamento de enterobactérias). A maioria deles é também diferencial, permitindo diferenciar as colônias (sólidos) dos microrganismos.

Meios de enriquecimento

Meios líquidos que servem também para inibir micro-organismos comensais dos espécimes clínicos e favorecer o crescimento dos possíveis patógenos, presentes em número pequeno. Exemplos incluem caldo selenito, caldo tetrationato e água peptonada alcalina, que são utilizados para recuperar patógenos de espécimes fecais.

Meios diferenciais ou indicadores

Certos meios são desenhados de maneira que determinadas bactérias possam ser reconhecidas com base na cor das suas colônias. Para isso, são incorporados corantes, substratos metabólicos, entre outros, para que a bactéria que os utiliza apareça com coloração diferente das demais. Exemplos incluem ágar MacConkey, ágar CLED, ágar XLD, entre outros.

Meios de transporte

Os espécimes clínicos devem ser transportados ao laboratório imediatamente depois da coleta para prevenir o crescimento excessivo de microrganismos comensais ou contaminantes. Para que esse transporte seja efetivo, são utilizados meios de transporte, os quais previnem o ressecamento (dessecação) do espécime e inibem o crescimento excessivo dos microrganismos comensais. Alguns desses meios são semissólidos em consistência (Stuart e Amies). A adição de carvão serve para neutralizar fatores inibitórios. O meio Cary Blair é utilizado para transportar fezes de pacientes com suspeita de cólera.

Meios para microrganismos anaeróbios

Bactérias anaeróbias necessitam de meios especiais para crescimento, porque elas precisam de pouco oxigênio, reduzido o potencial de oxidorredução e nutrientes extras. Meios para anaeróbios podem necessitar de suplementos extras, tais como hemina e vitamina K. Ferver o meio é uma maneira de eliminar e dissolver o oxigênio. A adição de glicose 1%, tioglicolato 0,1%, ácido ascórbico 0,1% e cisteína 0,05% podem resultar em um meio reduzido. O azul de metileno ou a resazurina são indicadores do potencial de oxirredução e são normalmente incorporados ao tioglicolato para indicar se o meio está adequado para uso. Em condições de redução do meio, o azul de metileno é incolor.

A seguir, serão apresentados o princípio e a utilização dos principais meios de cultura usados rotineiramente no laboratório de microbiologia para isolamento primário e identificação bioquímica dos microrganismos com maior relevância clínica.

Ágar sangue

- **Tipo:** enriquecido
- **Princípio:** é adicionado sangue desfibrinado de carneiro ou coelho (5%) ao ágar base para enriquecer o meio e possibilitar o melhor e mais rápido crescimento dos microrganismos. Os eritrócitos permanecem íntegros no meio, permitindo a visualização dos diferentes padrões de hemólise causados pelos microrganismos, sendo muito útil para auxiliar na identificação presuntiva especialmente de *Streptococcus* spp.
- **Utilidade:** cultivo primário da maioria dos espécimes clínicos; verificação de hemólise; prova do satelitismo para identificação presuntiva de *Haemophilus influenzae.*

Ágar chocolate

- **Tipo:** enriquecido
- **Princípio:** nesse meio, o sangue de cavalo, carneiro ou coelho (5%) adicionado ao ágar base é aquecido para a lise dos eritrócitos, liberando hemina e hematina, compostos essenciais para o crescimento de microrganismos exigentes.
- **Utilidade:** cultivo primário de alguns espécimes clínicos, crescimento de microrganismos exigentes, tais como *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Branhamella catarrhalis* e *Moraxella* spp.

Ágar Thayer-Martin Chocolate

- **Tipo:** meio de enriquecimento e seletivo
- **Princípio:** contém antimicrobianos que inibem o crescimento de neisserias comensais e outras bactérias, quando em amostras colhidas de sítios contaminados, favorecendo o crescimento das neisserias com potencial patogênico.
- **Utilidade:** usado para o isolamento seletivo de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*, a partir de espécimes clínicos.

Ágar Salmonella-Shigella (SS)

- **Tipo:** seletivo e diferencial
- **Princípio:** possui substâncias que inibem o crescimento de microrganismos Gram-positivos, tais como: sais biliares, verde brilhante e citrato de sódio. Além disso, contém lactose em sua composição, o que permite a diferenciação dos microrganismos Gram-negativos em fermentadores e não fermentadores da lactose. Isso porque a fermentação da lactose acidifica o meio, que, na presença do indicador vermelho neutro, forma colônias cor-de-rosa. As bactérias não fermentadoras da lactose mostram-se transparentes. Contém também tiossulfato de sódio e citrato férrico, os quais permitem a observação de produção de H_2S pelas bactérias, por meio do desenvolvimento de coloração negra no centro da colônia.
- **Utilidade:** selecionar e isolar espécies de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. em amostras de fezes, alimentos e água. Ambos os microrganismos são lactose negativos, entretanto, *Salmonella* spp. produz H_2S ao passo que *Shigella* spp. não produz.

Ágar MacConkey

- **Tipo:** seletivo e diferencial
- **Princípio:** o meio contém cristal violeta, que inibe o crescimento de microrganismos Gram-positivos. Também contém sais biliares (inibidor de Gram-positivos). Como a concentração desse sal não é tão elevada, como no SS, por exemplo, a inibição dos Gram-positivos pode não ser total. A lactose presente no meio permite a diferenciação dos fermentadores e não fermentadores da lactose.
- **Utilidade:** cultivo primário de muitos espécimes clínicos; crescimento de Gram-negativos; auxiliar na identificação presuntiva dos microrganismos Gram-negativos pela diferenciação em lactose positiva e negativa.

Ágar Cled

- **Tipo:** seletivo
- **Princípio:** permite o crescimento de patógenos urinários. Tem a lactose incorporada ao meio, permitindo a diferenciação de fermentadores e não fermentadores desse açúcar. Entretanto, como o indicador de pH é o azul de bromotimol (coloração inicial do meio: verde), fermentadores apresentam colônias amarelas. Esse meio é deficiente em eletrólitos e essa característica impede a proliferação do característico "véu" de amostras de *Proteus* spp.
- **Utilidade:** isolar e quantificar microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e leveduras, a partir, essencialmente, de urina.

Meio de Löwenstein-Jensen

- **Tipo:** enriquecido

- **Princípio:** a base do meio é constituída por ovos integrais, o que gera condições favoráveis para o crescimento das micobactérias.
- **Utilidade:** isolamento primário das micobactérias, a partir de diferentes espécimes clínicos.

Meio de Löwenstein e Middlebrook

- **Tipo:** bifásico
- **Princípio:** o meio é constituído de duas fases, uma sólida, que é o meio de Löwenstein-Jensen, e uma líquida, que é o meio 7H-9. Juntos, fornecem os nutrientes necessários para o desenvolvimento das micobactérias isoladas de espécimes clínicos. O meio líquido permite a recuperação de micobactérias, mesmo que essas estejam em quantidade pequena no espécime clínico.
- **Utilidade:** sistema desenvolvido para o isolamento de micobactérias do sangue e de materiais paucibacilares (número pequeno de bacilos álcool-ácido resistentes), como liquor, líquido pleural, biópsias, entre outros.

Ágar Mueller-Hinton

- **Tipo:** meio básico
- **Princípio:** sua formulação básica consiste em extrato de carne, caseína, amido e ágar. Foi o meio padronizado por Kirby e Bauer na década de 1960 para a realização do antibiograma. É atualmente recomendado pelos principais comitês de padronização de técnicas na microbiologia, incluindo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), para a maioria dos microrganismos de importância médica. Para alguns microrganismos específicos, como é o caso do *Streptococcus pneumoniae*, é necessário à adição de sangue de carneiro (5%) para suportar o crescimento do microrganismo.
- **Utilidade:** meio utilizado para a realização do teste de avaliação da resistência aos antimicrobianos pelos métodos de difusão em disco ou fitas de gradiente de concentração (E-test®, MICE®) para a maioria dos micro-organismos de importância médica.

Caldo BHI (Brain Hearth Infusion)

- **Tipo:** enriquecido
- **Princípio:** contém nutrientes derivados de infusão de cérebro e coração, além de peptona e dextrose. A peptona e a infusão são fontes de nitrogênio, carbono, enxofre e vitaminas. A dextrose é um carboidrato que os microrganismos utilizam para fermentação. Com essas características, permite o bom crescimento de muitas das bactérias de importância médica.
- **Utilidade:** meio para cultivo da maioria dos microrganismos de importância médica. Pode ser utilizado na preparação do inóculo para teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, para realização do teste da coagulase em tubo, para teste de crescimento bacteriano a 42 °C e 44 °C e para teste de motilidade em lâmina. Pode ser utilizado também na conservação de microrganismos se for adicionado um agente crioprotetor, como o glicerol.

Caldo tioglicolato com indicador

- **Tipo:** enriquecido
- **Princípio:** a composição do meio permite o crescimento de vários microrganismos. O potencial de oxirredução baixo do meio permite o crescimento de bactérias anaeróbias. A resazurina e o azul de metileno são indicadores da posição de oxidação de aeróbios, e a dextrose incluída na fórmula sustenta o crescimento de microrganismos que têm crescimento vigoroso na presença do carboidrato.
- **Utilidade:** usado para o cultivo de microrganismos aeróbios, microaerófilos e anaeróbios. Também é utilizado para controle de esterilidade bacteriana de diversos materiais.

Caldo selenito cistina

- **Tipo:** meio de enriquecimento e seletivo
- **Princípio:** tem por finalidade o enriquecimento seletivo de amostras de fezes, alimentos, água e outros materiais e produtos para o isolamento de *Salmonella* spp. O selenito de sódio inibe estreptococos fecais e coliformes durante as primeiras 8 a 12 horas de incubação, permitindo, desta forma, o desenvolvimento de salmonelas sem a interferência dos outros membros da microbiota fecal. A adição de cistina estimula o crescimento de *Salmonella* spp.
- **Utilidade:** utilizado para o enriquecimento e isolamento de *Salmonella* spp. em amostras de fezes, urina e alimentos.

Ágar base ureia (Christensen)

- **Tipo:** identificação bioquímica
- Princípio: determina a habilidade do microrganismo de degradar a ureia em duas moléculas de amônia pela ação da enzima urease, resultando na alcalinização do meio e mudança de coloração. O indicador presente no meio é o vermelho de fenol, a partir do qual a alcalinização leva à ocorrência de coloração rosa.
- **Utilidade:** auxiliar na identificação bioquímica de microrganismos, especialmente enterobactérias.

Ágar TSI (triple sugar iron)

- **Tipo:** identificação bioquímica
- **Princípio:** este meio contém três açúcares: glicose (0,1%), lactose (1%), sacarose (1%). Além disso, contém sulfato de ferro para a detecção da produção de H_2S (produção de cor preta no tubo). O indicador presente é o vermelho de fenol. A fermentação é indicada pela mudança da cor do indicador de pH de vermelho para amarelo. O ágar fundido é deixado solidificar, formando uma superfície inclinada. Essa configuração origina

duas câmaras de reação dentro do mesmo tubo. A porção inclinada ou bico, exposta em toda sua superfície ao oxigênio atmosférico, é aeróbia. A porção inferior, denominada profundidade ou fundo, está protegida do ar e é relativamente anaeróbia. Quando se prepara o meio, é importante que o bico e a profundidade tenham o comprimento igual ao redor de 3 cm cada um, de modo que o efeito das duas câmaras seja conservado.
- **Utilidade:** diferenciar bacilos Gram-negativos com base na fermentação de carboidratos, produção de sulfato de hidrogênio e gás.

Meio base para oxidação e fermentação (OF)

- **Tipo:** identificação bioquímica
- **Princípio:** verificar a capacidade do microrganismo de utilizar a glicose presente no meio pela via oxidativa ou fermentativa. A via fermentativa é aquela onde há utilização da glicose na ausência de oxigênio, ou seja, na base do meio. Na superfície, caso haja alteração da coloração do meio (de verde para amarelo), será indicativo de utilização da glicose por via fermentativa.
- **Utilidade:** diferenciar bacilos Gram-negativos em fermentadores e não fermentadores da glicose.

Ágar citrato de Simons

- **Tipo:** identificação bioquímica
- Princípio: verifica a capacidade da bactéria de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono, juntamente com sais de amônia, alcalinizando o meio. O indicador utilizado é o azul de bromotimol, o qual torna o meio azul quando alcalino, sendo verde a cor original do meio.
- **Utilidade:** auxiliar na identificação bioquímica de bacilos Gram-negativos.

Ágar bile esculina

- **Tipo:** identificação bioquímica
- Princípio: algumas bactérias são capazes de hidrolisar a esculina na presença de sais biliares. A esculina é um derivado glicosídico da cumarina. As duas moléculas do composto (glicose e 7-hidroxicumarina) estão unidas por uma ligação éster através do oxigênio. A esculina é incorporada em um meio contendo 4% de sais biliares. As bactérias com capacidade de hidrolisar a esculina na presença de sais biliares irão produzir glicose e esculetina a partir da molécula inicial. A esculetina, por sua vez, reage com íons férricos (fornecidos pelo composto inorgânico do meio – o citrato férrico), formando um complexo negro.
- **Utilidade:** diferenciação de espécies de *Streptococcus* spp. Identificação dos *Enterococcus* spp (bile esculina positivos). Na ausência de bile, a hidrólise da esculina pode ser utilizada para a identificação de bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose e enterobactérias.

Caldo base de Moeller

- **Tipo:** identificação bioquímica
- **Princípio:** as descarboxilases são um grupo de enzimas com substrato específico, capazes de reagir com o grupo carboxila dos aminoácidos para formarem aminas alcalinas. Essa reação, conhecida como descarboxilação, origina dióxido de carbono como produto secundário. São utilizados normalmente três aminoácidos para identificação dos microrganismos: lisina, ornitina e arginina. A base de Moeller é a mais utilizada. Os produtos aminados específicos são: cadaverina, putrescina e citrulina para lisina, ornitina e arginina, respectivamente. A conversão da arginina em citrulina é uma atividade de dihidrolase, e não descarboxilase, na qual o grupo NH_2 é retirado da arginina como primeira etapa. Em seguida, a citrulina é convertida em ornitina, que sofre descarboxilação para formar putrescina. A incubação deve ser em anaerobiose e, para isso, é adicionado 1 mL de óleo mineral estéril após a inoculação. No início da incubação, a glicose contida no meio é fermentada e ocorre viragem de cor púrpura para o amarelo. Quando o aminoácido é descarboxilado, as aminas alcalinas formadas revertem a cor do meio para o púrpura original.
- **Utilidade:** verificar a capacidade de microrganismos usarem enzimas, auxiliando na identificação bioquímica dos mesmos. Utilizado principalmente para identificação de enterobactérias, bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose e espécies de estafilococos.

Ágar DNase

- **Tipo:** identificação bioquímica
- **Princípio:** o meio é composto por triptona, cloreto de sódio e DNA molecular. A triptona fornece os nutrientes para o crescimento. O cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico. O DNA molecular permite a detecção da desoxirribonuclease (DNase) que despolimeriza o DNA. Após a incubação do meio com a cepa a ser testada, a placa é inundada com ácido clorídrico que, por sua vez, provoca a precipitação do DNA polimerizado, tornando o meio opaco. Os microrganismos que possuem a DNase produzem uma zona transparente em volta da área de crescimento, pois há a despolarização do DNA precipitado.
- **Utilidade:** é predominantemente utilizado na identificação dos *Staphylococcus*, mas também pode ser utilizado na detecção da atividade de DNase em outros micro-organismos. Os principais, de importância médica, que apresentam prova da DNase positiva são: *Staphylococcus aureus*, *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Cryseobacterium meningosepticum*, *Moraxella catarrhalis*.

Ágar fenilalanina

- **Tipo:** identificação bioquímica
- **Princípio:** verifica a capacidade da bactéria de produzir ácido fenilpirúvico a partir da fenilalanina por ação

enzimática. O aminoácido aromático fenilalanina é desaminado oxidativamente, por uma aminoácido-oxidase, a fenilalanina-desaminase, produzindo ácido fenilpirúvico. O cloreto férrico, que deve ser adicionado ao meio após incubação, é um agente quelante que se liga ao ácido fenilpirúvico, formando uma coloração verde.

- **Utilidade:** diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias. A atividade de fenilalanina-desaminase é característica de *Morganella morganii* e todas as espécies de *Proteus* e *Providencia*.

Meio de Rugai

- **Tipo:** identificação bioquímica
- **Princípio:** em um único tubo, estão contidos diferentes substratos que elucidam características bioquímicas distintas dos bacilos Gram-negativos. Sua finalidade principal é a triagem bioquímica de colônias isoladas nos meios seletivos para bacilos Gram-negativos oxidase-negativos. No mesmo tubo, é possível verificar nove reações: motilidade da bactéria, indicada pela turvação da lisina na base; descarboxilação da lisina; fermentação da glicose em profundidade e da sacarose na superfície do meio; produção de H_2S; produção de gás em glicose; utilização do aminoácido L-triptofano (desaminação); hidrólise da ureia e, no tampão do tubo, um desenvolvimento de coloração avermelhada que indica a formação de indol.
- **Utilidade:** identificação presuntiva das principais espécies de enterobactérias.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. ANVISA. Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://ww.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_4_2004.pdf
2. Atlas TM, Snyder JW. Reagents, stains, and media: bacteriology. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, et al. Manual of Clinical Microbiology. 10.ed. Washington: American Society for Microbiology, 2011. p.331-49.
3. Coelho RRR. Técnicas de isolamento e contagem de microorganismos. In: Vermelho AB, Pereira AF, Coelho RRR, et al. Práticas de Microbiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
4. Estridge BH, Reynolds AP. Técnicas de Cultura para Bactérias – Técnicas Básicas de Laboratório Clínico. 5.ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2008.
5. Koneman EW. Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido. 6.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008.
6. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, et al. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 3.ed. São Paulo: Sarvier Editora, 2010.
7. Todar's online textbook of bacteriology. Nutrition and growth of bacteria. [Internet] [Acesso em 31 mar 2017]. Disponível em: http://textbookofbacteriology.net/nutgro.html
8. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Crescimento Microbiano - Microbiologia 8.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2005.

42

capítulo

Marcelo Pilonetto ▪ Pedro Peloso

Microbiologia Automatizada

INTRODUÇÃO

A Microbiologia Diagnóstica tem permanecido praticamente a mesma desde as descobertas de Pasteur e Koch no século XIX. Portanto, os métodos utilizados na maioria dos laboratórios clínicos hoje em dia ainda baseiam-se nas antigas técnicas de microscopia e cultivo em ágar, algumas das quais persistem em nossas rotinas por mais de dois séculos.

Entretanto, embora tenha demorado mais que nos outros setores do Laboratório, o avanço tecnológico finalmente chegou à Microbiologia. Especialmente nos últimos 10 a 20 anos, o que temos observado é uma verdadeira revolução nos métodos de detecção de microrganismos, identificação e determinação de mecanismos de resistência. Essas mudanças começaram na década de 1980 e se intensificaram a partir do século XXI, com o avanço e popularização das técnicas de PCR, com o desenvolvimento das novas gerações de sequenciamento e com a introdução da espectrometria de massa nos laboratórios de rotina.

A identificação de microrganismos é a principal atividade do laboratório de Microbiologia. Uma identificação eficaz é de fundamental importância, pois permite determinar o prognóstico do paciente, orienta a antibioticoterapia e permite uma análise epidemiológica mais consistente. Geralmente a identificação bacteriana é realizada utilizando-se testes fenotípicos, incluindo cultura, coloração de Gram e testes bioquímicos. A coloração de Gram é um método de identificação preliminar que possibilita obter resultados em alguns minutos, porém a identificação definitiva requer testes bioquímicos, que geralmente demoram de 18 a 24 horas para serem concluídos. Os testes moleculares como PCR em tempo real e especialmente o sequenciamento genético têm sido utilizados como ferramenta de identificação bacteriana.

A identificação fenotípica de bactérias ainda é realizada em muitos laboratórios utilizando-se métodos convencionais, como provas bioquímicas. Porém a evolução tecnológica possibilitou o surgimento de várias metodologias comerciais, como a identificação automatizada de bactérias. Existem diversas vantagens nesses sistemas, como a rapidez (6 a 8 horas, comparado a 18 a 72 horas no método manual), a extensa base de dados contendo vários biótipos disponíveis, a quantidade de provas bioquímicas utilizadas para identificação de cada espécie (20 a 30 provas), entre outras. Entretanto, diversos estudos relatam a dificuldade em estabelecer com segurança uma identificação laboratorial definitiva, mesmo utilizando sistemas automatizados, especialmente quando o isolado for um microrganismo raro ou atípico.

Neste capítulo abordaremos tanto os métodos automatizados para detecção, identificação e testes de suscetibilidades de microrganismos, como as ferramentas moleculares mais recentes, como o PCR automatizado, MALDI-TOF e sequenciamento genético.

IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA E TESTE DE SENSIBILIDADE

Histórico

Os primeiros sistemas de identificação microbiana automatizados foram os Autobac Series II (anteriormente chamado de Autobac; Organon-Teknika, Durham, N.C.), o Avantage Microbiology Center (anteriormente chamado de Abbott MS-2) e o Quantum II Microbiology System (Abbott Laboratories Diagnostic Division, Irving, Texas).

O Autobac Série II utilizava uma cubeta de plástico com 19 cavidades e interpretava automaticamente os resultados de testes bioquímicos. Uma câmara era um controle positivo de crescimento, e as outras 18 continham substratos constituídos por antibióticos, corantes ou outros produtos químicos. Membros comuns da família *Enterobacteriaceae* e seis espécies ou grupos de bacilos não fermentadores oxidase-positivos podiam ser identificados por inibição do crescimento. Após a incubação da cubeta por 3 a 6 horas, um fotômetro determinava automaticamente o crescimento e a inibição por meio da análise do índice de dispersão da luz de cada câmara. Um programa de análise discriminante quadrática de dois estágios era, então, utilizado para identificar o isolado. O Avantage Microbiology Center e o Quantum II Microbiology System usavam um sistema de cartão plástico transparente com 20 cavidades para a identificação de bacilos aeróbicos Gram-negativos ou leveduras. O cartão Abbott Bacterial Identification e o Cartão Abbott Yeast Identification continham, cada um, 20 substratos liofilizados. Os dados do Avantage e do Quantum II incluíam informações para a identificação

de 29 gêneros ou espécies da família *Enterobacteriaceae*, dois *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, três espécies de *Pseudomonas* ou grupos, cinco outros bacilos Gram-negativos oxidase-positivos, quinze *Candida* spp., oito *Cryptococcus* spp., cinco *Rhodotorula* spp. e quatro gêneros de leveduras adicionais. Após a inoculação dos cartões, a referência turbidimétrica ou leituras colorimétricas eram obtidas pelas câmaras de provas bioquímicas. Com o Avantage, essas leituras ópticas eram determinadas simultaneamente por diodos emissores de luz e fotodetectores combinados, enquanto o Quantum II utilizava um espectrofotômetro de duplo comprimento de onda para ler as câmaras bioquímicas em sequência. Após a incubação em 35 °C a 37 °C durante 4 a 6 horas ou a 30 °C durante 22 a 24 horas, as leituras são novamente obtidas para determinar alterações turbidimétricas ou alterações colorimétricas. Os isolados eram identificados por comparação dos resultados dos testes bioquímicos (oxidase, indol, os resultados dos testes para as bactérias e os resultados dos testes do germe-tub para leveduras, que eram inseridos manualmente) com uma matriz de probabilidade.

VITEK

O sistema Vitek teve suas origens na década de 1960, quando a McDonnell Douglas foi contratada pela National Aeronautics and Space Administration (NASA) para desenvolver um sistema automatizado para a detecção e identificação de agentes patogênicos diretamente a partir da urina de astronautas no espaço. Esse sistema foi posteriormente modificado e apresentado à microbiologia clínica como o Sistema AutoMicrobic, em 1976. O sistema Vitek, baseado no crescimento bacteriano em micropoços de cartões de plástico, poderia identificar nove patógenos urinários comuns diretamente de amostras de urina e usar o conceito de número mais provável para determinar a presença de $\geq 4{,}5 \times 10^4$ UFC (unidades formadoras de colônia) por mL na urina. O sistema Vitek desenvolveu mais tarde cartões adicionais que exigiam culturas puras para os inóculos. Esses cartões de 30 micropoços continham antibióticos ou substratos bioquímicos. Os cartões de teste de suscetibilidade estão disponíveis tanto para bacilos Gram-negativos como Gram-positivos, com 11 agentes antimicrobianos por cartão. Os resultados estão disponíveis entre 4 a 8 horas. Mais de 40 agentes antimicrobianos estão atualmente disponíveis nos cartões, e os resultados de cada teste incluem uma CIM (concentração inibitória mínima), bem como a interpretação de categorias sensíveis, intermediárias e resistentes segundo o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) vigente. Os cartões de identificação interpretados automaticamente pelo sistema Vitek são a identificação de Gram-negativos (GNI), de Gram-positivos (GPI), e de leveduras (YBC). Os cartões de identificação que requerem incubação fora do sistema e entrada manual dos resultados para o computador são os de anaeróbios e os de *Neisseria/Haemophilus*. O GNI e GPI contêm 29 substratos e um controle de crescimento. Os substratos do GNI incluem 25 substratos bioquímicos convencionais, três substratos próprios e um antibiótico. No GNI deve ser marcado se o organismo é oxidase-positivo. A base de dados do GNI inclui informações para a identificação de 46 espécies de membros da família *Enterobacteriaceae* e 39 espécies de outros bacilos Gram-negativos. Os substratos do GPI incluem 26 testes bioquímicos convencionais, dois antibióticos e um corante. O GPI deve ser marcado para os catalase-negativos, e para as β-hemólises, ou para organismos coagulase-positivos que são catalase-positivos. A base de dados do GPI inclui informações para a identificação de 23 espécies de *Streptococcus*, 4 espécies de *Enterococcus*, 16 espécies de *Staphylococcus*, 4 de *Corynebacterium* e 4 de *Aerococcus*, *Listeria monocytogenes* e *Erysipelothrix rhusiopathiae* ou grupos. O YBC contém 26 substratos que são baseados em métodos convencionais. A base de dados do YBC inclui informações para a identificação de 16 espécies de *Candida*, 6 espécies de *Cryptococcus*, 3 espécies de *Rhodotorula*, 2 espécies de *Trichosporon*, 3 espécies *Geotrichum*, 2 espécies de *Prototheca*. O sistema Vitek é um sistema modular integrado com uma unidade de enchimento/selante e outra de leitor/incubadora, módulo do controle de computador, terminal de dados e impressora. O Vitek pode ser adquirido com capacidade de 30, 60, 120 ou 240 cartões e pode ser conectado com outros computadores. Os inóculos para os cartões de identificação podem ser preparados a partir de meios seletivos ou não seletivos. Os inóculos para os cartões GNI, GPI e YBC são preparados suspendendo-se várias colônias em 1,8 mL de 0,45% a 0,5% de solução salina e ajustando-se a suspensão para o equivalente de 1.0 (GNI e GPI) ou 2.0 (YBC) padrão de McFarland. O inóculo é automaticamente transferido para o cartão por meio de um tubo durante o ciclo de vácuo do módulo de enchimento e selamento do cartão. O GNI e o GPI são colocados em bandejas de plástico, cada bandeja com capacidade para até 30 cartões. O tabuleiro é colocado na leitora/incubadora a 35 °C e, em intervalos de hora em hora, é realizada uma leitura ótica analógica digitalizada, proporcional à atenuação da luz para cada micropoço por cartão. A primeira leitura normalmente estabelece um valor de referência, pela quantidade de redução de luz causada por crescimento e reação bioquímica no micropoço, determinada em leituras subsequentes. Uma mudança mínima predeterminada é necessária para diferenciar entre as reações positivas e negativas. A identificação final do GNI é relatada entre 4 e 18 horas. A maior parte dos bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose são identificados em até 18 horas. Os microrganismos identificados pelo GPI são finalizados entre 4 e 15 horas. O YBC é incubado fora do sistema, a 30 °C durante 24 horas e, em seguida, colocado no leitor/incubadora para uma única leitura. Uma mensagem "reincubar durante 24 horas a 30 °C" indica que uma identificação definitiva requer mais tempo de incubação. Em 48 horas, uma marca de 48 horas deve ser feita no cartão e obter uma segunda leitura. Os resultados dos testes bioquímicos para todos os cartões são comparados com a base de dados, e as primeiras e segundas escolhas, conforme as suas probabilidades e percentuais, são relatadas. Os resultados dos testes bioquímicos, bem como os testes suplementares, se necessário, são impressos.

VITEK 2

Lançado em 1997, o VITEK 2 é um sistema automatizado que utiliza tecnologia baseada no crescimento bacteriano. O sistema está disponível em três formatos (VITEK 2 Compact, VITEK 2 e VITEK 2 XL) que diferem em níveis crescentes de capacidade e automação.

VITEK 2 Compact

Lançado em 2004, esse formato se destina a testes de microbiologia industrial e também para laboratórios clínicos de volume médio. Características desenvolvidas especificamente para microbiologia industrial incluem conformidades 21 CFR Part 11 (para registros eletrônicos e assinaturas) e um cartão com reagente colorimétrico (BCL) utilizado para identificar os bacilos Gram-positivos formadores de esporos (*Bacillus* e gêneros afins). Os outros cartões de reagentes colorimétricos (GN, GP, YST) aplicam-se para todos os formatos do sistema para ambos os laboratórios, industriais e clínicos.

VITEK 2 e VITEK 2 XL

Estes formatos são mais focados no laboratório de microbiologia clínica e fornecem maiores níveis de automação e capacidade para laboratórios de maior volume. Eles também fornecem uma opção de pipetagem e diluição automática para os testes de suscetibilidade antimicrobiana. O VITEK 2 XL mudou drasticamente a forma como processamos as amostras em microbiologia. O novo sistema é totalmente automatizado, de modo que praticamente todos os passos manuais foram eliminados. Ele também reduziu significativamente a quantidade de trabalho que os técnicos de laboratório despendiam no processamento de uma amostra. Uma vez que o isolamento primário é realizado, o inóculo padronizado é colocado em um cassete e um número de identificação da amostra é automaticamente inserido no Smart Station®. Um *scanner* de mão lê o código de barras diretamente do cartão para uma maior rastreabilidade da amostra do paciente. Além disso, a estação Smart Carrier® reduziu a quantidade de tempo em que os microbiologistas manipulavam as suspensões bacterianas que ligam a amostra ao cartão utilizado. Depois de carregar as amostras para o VITEK® 2 XL, o instrumento assume e faz o resto, não é necessário introduzir manualmente os números de acesso ou fazer as diluições para painéis de suscetibilidade. O instrumento corta os canudos e coloca os cartões na câmara de leitura. Outra importante característica do VITEK 2 é o Expert System® (ES). O Expert System® analisa automaticamente as CIM (concentrações inibitórias mínimas) e detecta os padrões fenotípicos para a maioria dos microrganismos, fornecendo uma "impressão digital" pelo reconhecimento dos mecanismos de resistência bacteriana. As características fenotípicas e padrões de resistência bacteriana também são uma parte importante na tarefa de identificar várias cepas bacterianas e perfis de suscetibilidade. O banco de dados de interpretação do VITEK 2 Expert System® foi criado a partir de mais de 100.000 referências. Uma vez que uma amostra é lida, o ES compara-a com mais de 2.000 fenótipos descritos e distribuições de valores da concentração inibitória mínima (CIM). O ES pode detectar mais de 100 mecanismos de resistência em mais de 99 microrganismos, através das diluições dos cartões de suscetibilidade que podem ser compostos por cinco a sete diluições por antibiótico para determinação da CIM, além de algumas configurações específicas com diluições estendidas para determinação de resistências de baixo nível.

Cartões de identificação

Os cartões de identificação têm 64 poços que contêm um substrato individual. Os substratos medem diversas atividades metabólicas, como a acidificação, alcalinização, hidrólise enzimática e o crescimento na presença de substâncias inibidoras. Uma película transparente está presente em ambos os lados do cartão e permite o nível adequado de transmissão de oxigênio, mantendo o recipiente selado, o que impede o contato com os substratos e o microrganismo. Cada cartão tem um tubo de transferência pré-inserido utilizado para a inoculação. Os cartões têm códigos de barras que contêm informações sobre o tipo de produto, número de lote, data de validade e um identificador exclusivo que pode ser ligado à amostra, quer antes ou depois de carregar o cartão no sistema. Um sistema óptico de transmitância permite a interpretação de reações do teste usando diferentes comprimentos de onda no espectro visível. Durante a incubação, cada reação no cartão é lida a cada 15 minutos, para medir tanto a turvação ou a mudança de cor do substrato. Além disso, um algoritmo especial é utilizado para eliminar falsas leituras devidas a pequenas bolhas de ar que podem estar presentes.

Cartão GN (*Gram-negative*)

O cartão de GN é utilizado para a identificação taxonômica automática de 150 espécies de bacilos Gram-negativos, a maioria fermentadora e não fermentadora de glicose. O cartão de GN é baseado em métodos bioquímicos estabelecidos e substratos recém-desenvolvidos, medindo a utilização da fonte de carbono, as atividades enzimáticas e resistência. Tem 47 testes bioquímicos e um controle negativo. Resultados de identificação final estão disponíveis em cerca de 10 horas ou menos.

Cartão GP (*Gram-positive*)

O Cartão GP é utilizado para a identificação taxonômica automática de 115 espécies de bactérias Gram-positivas não formadoras de esporos (principalmente cocos). Contém 43 testes bioquímicos que medem a utilização da fonte de carbono, as atividades enzimáticas e resistência. Resultados de identificação finais são disponíveis em cerca de oito horas ou menos.

Cartão YST (leveduras)

O cartão YST é utilizado para a identificação taxonômica automática de 49 espécies de leveduras significativas e organismos correlatos.

Outros cartões

Além desses três cartões principais, também são oferecidos cartões para a identificação de *Neisseria, Haemophilus* e outros bacilos Gram-negativos fastidiosos (NH ID Card) e um cartão para a identificação de bactérias anaeróbias e bacilos Gram-positivos corineformes (ANC ID Card).

Cartões de suscetibilidade

Uma extensa gama de cartões de suscetibilidade está disponível para uso no Sistema Vitek. Eles são divididos em cartões para testes frente aos bacilos Gram-negativos, cocos Gram-positivos e leveduras. Todos com no mínimo 5 a 7 diluições por antibiótico em diversas apresentações. Além do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, também estão disponíveis, nos mesmos cartões, testes de confirmação de resistência fenotípica como, por exemplo: produção de ESBL (betalactamase de espectro estendido), resistência induzida aos MLS (macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas) e resistência à oxacilina (através do *screening* com cefoxitina). Dependendo do microrganismo e do antibiótico testado, alguns resultados podem ser liberados em até 4 horas de incubação em resultados parciais.

SISTEMA MICROSCAN WALKAWAY

Os Sistemas WalkAway 40 e 96 (Siemens, Sacramento, CA) são controlados por computador e vão incubar painéis de microdiluição e automaticamente interpretar os resultados bioquímicos ou de suscetibilidade através de um fotômetro ou um leitor fluorogênico. O Sistema MicroScan também fabrica o autoSCAN-4, que requer a incubação dos painéis fora do sistema e, com exceção de painéis fluorogênicos, irá testar os mesmos painéis como os outros dois sistemas automatizados. Todos os três sistemas realizam testes de sensibilidade para bacilos Gram-negativos aeróbicos, bactérias Gram-positivas e bactérias anaeróbias. Os painéis fluorogênicos proporcionam um resultado da suscetibilidade entre 3,5 a 7 horas para os bacilos Gram-negativos aeróbicos e entre 3,5 a 15 horas para as bactérias aeróbicas Gram-positivas. Os painéis convencionais fornecem um resultado de suscetibilidade entre 15 a 24 horas para as bactérias aeróbias (bacilos e cocos) e entre 24 a 48 horas para os anaeróbios. O Sistema MicroScan tem vários tipos de painéis, incluindo tanto painéis com concentração inibitória mínima como também os painéis de *breakpoint*. Painéis personalizados também estão disponíveis. Os três sistemas identificam automaticamente bacilos Gram-negativos, bactérias Gram-positivas, bactérias aeróbias fastidiosas, leveduras e anaeróbios. Os painéis fluorogênicos, rápidos para identificação de bacilos Gram-negativos e bactérias Gram-positivas, utilizam substratos fluorogênicos (4-metilumbeliferona ou 7-amino-4-metilcumarina ligado a um fosfato, açúcares ou aminoácidos) ou indicadores fluorimétricos. A identificação baseia-se na hidrólise de substratos fluorogênicos, mudanças de pH após a utilização do substrato, produção de determinados subprodutos metabólicos ou a taxa de produção de metabólitos específicos após 2 horas de incubação. O painel convencional para identificação de bacilos Gram-negativos tem 29 substratos convencionais ou cromogênicos e seis antibióticos, e os resultados estão disponíveis entre 15 a 42 horas. Tanto os painéis rápidos ou os convencionais incluem na sua base de dados informações para a identificação de 59 grupos, gêneros ou espécies de membros da família *Enterobacteriaceae* e 57 grupos, gêneros, ou espécies de bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose oxidase-positivos. O painel convencional para identificação de bactérias Gram-positivas tem 25 substratos convencionais ou cromogênicos, um corante e três antibióticos e proporciona uma identificação entre 15 a 42 horas. Tanto o painel rápido quanto o convencional incluem base de dados para a identificação de 24 gêneros ou espécies da família *Micrococcaceae*, 18 membros da família *Streptococcaceae,* 4 *Enterococcus* spp., *Streptococcus* sp., *Aerococcus* e *L. monocytogenes*. O painel rápido para identificação de *Haemophilus* e *Neisseria* tem 17 substratos convencionais, testes cromogênicos e um antibiótico, e sua base de dados inclui informação de identificação de *Haemophilus influenzae* (sete biótipos), *Haemophilus parainfluenzae* (quatro biótipos), *Haemophilus aphrophilus-Haemophilus paraphrophilus,* quatro espécies de *Neisseria*, *Moraxella catarrhalis e Gardnerella vaginalis* em 4 horas. O painel rápido de identificação para anaeróbios tem 24 substratos tradicionais ou cromogênicos modificados, e a base de dados inclui informação de identificação de 21 bacilos anaeróbios Gram-negativos,13 bacilos Gram-positivos anaeróbios não formadores de esporos, 8 cocos Gram-positivos anaeróbios e 16 clostrídios em 4 hoas de incubação. O painel rápido de identificação de leveduras tem 27 substratos tradicionais ou cromogênicos modificados, e a base de dados inclui informação de identificação de 16 *Candida* spp., 8 *Cryptococcus* spp. e 11 gêneros (representando 16 espécies) de leveduras ou microrganismos correlatos em 4 horas. O WalkAway 96 e WalkAway 40 são compostos de uma incubadora, umidificador ultrassônico, carrossel de torres móveis, leitor de código de barras, espectrofotômetro, leitor fluorimétrico, subsistema de distribuição de reagente, mecanismo de acesso ao painel, computador para a programação do painel e do rastreamento. O operador se comunica com esses sistemas a partir do teclado e do monitor de um computador pessoal por meio do gerenciamento de dados do MicroScan Software System (DMS). A DMS produz relatórios de resultados, relatórios epidemiológicos, registros de trabalho e antibiogramas. Os resultados podem ser exibidos em um monitor ou impressos. O Programa Pharm-Link, que permite a interação da farmácia com o sistema MicroScan, pode ser adicionado. Os painéis MicroScan podem ser inoculados por meio de metodologia padrão de suspensão ajustada de McFarland com o uso de um densitômetro que acompanha o sistema ou por meio do uso do sistema de inoculação rápida Prompt®. O Sistema Prompt® e o Sistema RENOK® de inoculação fornecem uma solução simples e rápida para agilizar o fluxo de trabalho. O Sistema Prompt utiliza uma ponteira plástica única para padronizar os inóculos sem a necessidade de ajustamentos de turbidez. As suspensões bacterianas preparadas, utilizando-se o Sistema Prompt, são padronizadas e estáveis por até 4 horas. O Sistema

RENOK transfere as suspensões para um painel MicroScan com facilidade, inoculando todos os poços de uma só vez. A etiqueta de código de barras para a identificação do paciente é impressa pela DMS e colada ao lado do painel de identificação e teste de sensibilidade. O WalkAway irá processar qualquer combinação de painéis fluorogênicos ou convencionais, que podem ser aleatoriamente carregados nas prateleiras da torre do carrossel. Após o fechamento da porta da incubadora, o leitor de código de barras verifica cada painel na torre e, em seguida, o computador verifica os horários de leitura basal, a incubação, a adição de reagente e quando será a próxima leitura para cada painel. Atualmente, até 12 reagentes podem ser utilizados. Para o leitor fluorogênico, a fonte de luz é uma lâmpada incandescente de quartzo-halogênio filtrada de modo que a luz UV de 370 nm é focada em cada um dos 96 poços. Qualquer fluoróforo livre presente nos poços irá emitir uma luz a 450 nm. Comprimentos de onda sem fluoróforo são filtrados a partir dessa luz, e a luz é focalizada sobre um detector. Variações normais nas leituras do painel são compensadas por um disco fluorescente de referência. Quando os painéis usados são os convencionais, a leitura é realizada por uma fonte de luz de tungstênio-halogênio que passa por filtros de interferência em uma roda de cor e está focada em 97 fibras ópticas, 96 das quais, de forma independente, iluminam cada poço em separado do painel de 96 poços. O fotômetro de número 97 origina uma leitura basal com a qual todas as outras leituras do fotômetro são comparadas. A roda de cores gira durante cada ciclo de leitura e, dependendo da fonte ideal de luz para cada substrato, será fornecida uma leitura de um dos seis comprimentos de onda diferentes. Os dados são transferidos para o computador, onde os resultados são convertidos para um bionúmero e comparados com probabilidades da base de dados. Todos os painéis MicroScan convencionais podem ser lidos automaticamente pelo sistema ou também visualmente de forma manual. Além do sistema que gerencia o equipamento, o WalkAway conta também com o *software* LabPro Alert System, que é o *software* que complementa a gestão de dados dos resultados dos testes de suscetibilidade, automatizando a detecção de resultados atípicos, fenótipos que necessitem comunicação às Comissões de Controle de Infecção Hospitalar ou que precisem de revisão do microbiologista. As regras podem ser personalizadas pelo usuário em função do perfil do laboratório. O LabPro também é customizado pelo fabricante para seguir os pontos de corte do CLSI ou do EUCAST em função da região ou legislação vigente onde será instalado o sistema.

SISTEMA BD PHOENIX®

O Sistema BD Phoenix® (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) é um sistema automatizado de identificação rápida e suscetibilidade antimicrobiana de bactérias clinicamente relevantes. Esse sistema foi lançado em setembro de 2004 e utiliza uma metodologia de teste de sensibilidade dupla utilizando tanto a turbidez como um indicador de oxirredução. O sistema pode realizar simultaneamente de 1 a 100 identificações e testes de sensibilidade em três formatos: só identificação, só o teste de sensibilidade ou identificação e teste de sensibilidade combinados. Não é necessário nenhuma adição de reagentes ou testes de bancada na sua utilização. O sistema inclui o *software* EpiCenter BD® de gerenciamento de dados, que trabalha para garantir a precisão e a consistência dos resultados dos pacientes, utilizando-se de outros dois sistemas específicos: BDXpert® e BD EpiCare®. O EpiCenter inclui uma extensa biblioteca epidemiológica concebida para ser utilizada em tempo real e simultaneamente por profissionais de laboratório, assim como os médicos, comissão de controle de infecção e farmacêuticos. O painel combinado para o sistema BD Phoenix® consiste em um lado com provas para identificação bacteriana, com 51 cavidades, e outro lado com o teste de sensibilidade, com 85 cavidades. O lado de identificação possui 45 cavidades contendo substratos bioquímicos desidratados e 2 cavidades para controle de fluorescência. O lado do teste de sensibilidade contém potencialmente até 84 cavidades com agentes antimicrobianos desidratados e uma cavidade para controle de crescimento. O sistema utiliza um indicador de redox colorimétrico otimizado para o teste de sensibilidade e diversos indicadores colorimétricos e fluorimétricos para a identificação. Muitos dos testes presentes nos painéis com identificação são modificações de métodos clássicos: testes de fermentação, oxidação, degradação e hidrólise de vários substratos. O sistema BD Phoenix® utiliza substratos cromogênicos e fluorogênicos, bem como substratos que são fontes únicas de carbono, para a identificação de organismos. O TSA do BD Phoenix® consiste em uma versão miniaturizada e modificada da técnica de diluição seriada em caldo. O teste de sensibilidade do sistema determina o crescimento bacteriano na presença de diferentes concentrações do agente antimicrobiano nas cavidades dos painéis, que são continuamente incubados e lidos, além de utilizar um indicador para verificação da presença de metabolismo microbiano no meio. A porção de identificação do painel utiliza diversos testes bioquímicos convencionais, cromogênicos e fluorogênicos para identificar o microrganismo. Utilizam-se tanto substratos baseados no crescimento bacteriano quanto substratos enzimáticos para englobar os diferentes tipos de reatividade dentro da faixa de variação taxonômica. Os testes baseiam-se na utilização e degradação de substratos específicos pelos microrganismos, detectadas por diversos sistemas indicadores. Quando um isolado consegue utilizar um substrato de carboidrato, a produção de ácido é detectada por uma alteração no indicador de vermelho fenol. Os substratos cromogênicos produzem uma cor amarela em caso de hidrólise enzimática de compostos de P-nitrofenil ou P-nitroanilida. A hidrólise enzimática de substratos fluorogênicos libera um derivado fluorescente da cumarina. Microrganismos que utilizam uma determinada fonte de carbono reduzem o indicador baseado em resazurina. Além desses, existem outros testes que detectam a capacidade de um organismo de hidrolisar, degradar, reduzir ou utilizar um substrato. O sistema utiliza um indicador de redox para detectar o metabolismo bacteriano no meio contendo agente antimicrobiano. Para determinar o crescimento bacteriano, utilizam-se medições

contínuas das mudanças ocorridas no indicador, assim como a turbidez do meio. A configuração de cada painel para o teste de sensibilidade contém diversos agentes antimicrobianos com uma ampla faixa de diluições seriadas (mínimo de três diluições), a identificação do microrganismo é utilizada para interpretar os valores da concentração inibitória mínima (CIM) de cada agente antimicrobiano. Os testes de sensibilidade detectam diversos mecanismos e marcadores de resistência de microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos. Os marcadores de resistência, associados a alarmes configurados no sistema, indicam resultados críticos que são informados imediatamente ao usuário. O sistema também pode contar com o módulo BD Phoenix AP, que é o primeiro sistema a incorporar nefelometria automatizada em identificação e testes de sensibilidade. Essa etapa tem sido tradicionalmente a mais demorada, no que diz respeito à preparação do isolado. Para inocular um painel usando o Phoenix AP, basta fazer uma suspensão "pesada" do isolado a ser testado. O equipamento é capaz de processar uma escala de McFarland partindo de 0,20 até 4,0 para cada teste específico. O tubo de identificação e o caldo do teste de sensibilidade são colocados em uma rack e carregados no sistema para a preparação. O tempo estimado de processamento de rack é de 5 a 7 minutos. Cada Phoenix AP é capaz de processar 200 identificações e testes de sensibilidade em menos de 4,5 horas. Ele também incorpora o código de barras do Epicenter® para o rastreamento da amostra. Cada tubo de identificação pode ser identificado com uma etiqueta de código de barras gerada pelo Epicenter®, que pode incluir o nome do paciente, localização do paciente, número de acesso da amostra, tipo de amostra, tipo de painel e número do isolado. Utilizando-se o código de barras do Epicenter, elimina-se a necessidade de digitações adicionais, agilizando ainda mais o processo de carregamento dos painéis.

Hemocultura Automatizada

HEMOCULTURA, PRINCÍPIOS BÁSICOS

O reconhecimento rápido e instituição imediata de tratamento adequado são essenciais nas bacteremias. O diagnóstico laboratorial de bacteremias e fungemias dependem das hemoculturas que são, provavelmente, as mais importantes culturas realizadas pela microbiologia. Uma vez que os métodos de cultura são tão sensíveis, o procedimento de coleta deve ser cuidadosamente controlado na fase pré-analítica (coleta), para evitar a má interpretação por uma possível contaminação com microrganismos da pele. Uma cultura de sangue consiste geralmente na coleta de uma única punção venosa inoculada em dois frascos separados para acomodar o volume de sangue removido (geralmente 20 mL para adultos). O uso de mais de uma formulação de meio (geralmente um aeróbio e um anaeróbio) para cada cultura de sangue geralmente maximiza a recuperação de todos os possíveis patógenos. O volume adequado é o único fator mais importante na detecção de microrganismos na corrente sanguínea; quanto mais volume de sangue coletado, maior a sensibilidade do método. O volume total de sangue coletado deve ser dividido igualmente entre, pelo menos, duas punções venosas em separado, para permitir a avaliação da possibilidade de contaminação por algum microrganismo da pele.

METODOLOGIA AUTOMATIZADA – HISTÓRICO

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para reduzir o tempo de manipulação técnica para detectar hemoculturas positivas de forma mais confiável, para reduzir a taxa de contaminação e para identificar as culturas positivas mais rapidamente do que os sistemas manuais. O impacto clínico positivo da rápida identificação de hemoculturas positivas tem sido bem estabelecido. A detecção do aumento das concentrações de CO_2 devido à atividade metabólica microbiana é amplamente aplicada com diferentes técnicas. Os primeiros instrumentos introduzidos no início da década de 1970 para detectar as concentrações de CO_2 nos frascos de hemoculturas foram os sistemas radiométricos BACTEC 225, 301 e 460 (Johnston Laboratories, agora Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems). O meio de cultura continha substratos marcados com C14 radioativo, que eram liberados como $^{14}CO_2$ no frasco durante o metabolismo microbiano. Uma alíquota da amostra de cada garrafa era coletada por meio de uma agulha esterilizada por calor. Essa amostra era então analisada quanto à radioatividade, de modo que os instrumentos poderiam estabelecer índices de crescimento. A principal desvantagem do sistema era a necessidade de reagentes radioativos. Com o desenvolvimento da detecção de CO_2 por espectrofotometria de raios infravermelhos, uma nova geração de instrumentos foi introduzida na década de 1980 por Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, com a vantagem de não necessitar de reagentes radioativos. Além disso, esses instrumentos (BACTEC 660 e 730) reduziam os processos manuais, reduzindo o tempo de manuseio. Frascos permitindo uma inoculação de até 10 mL de sangue tornaram-se disponíveis; os frascos anteriores eram limitados a apenas 5 mL. Em 1990, o mais automatizado instrumento (BACTEC 860) foi apresentado. Todos os três instrumentos compartilhavam a desvantagem de que cada frasco precisava

ser perfurado para coletar uma amostra de ar, o que reduzia a rapidez e, adicionalmente, esse procedimento aumentava o risco de contaminação cruzada a partir de um resultado positivo para outro anteriormente negativo. Durante a época em que esses instrumentos BACTEC eram mais utilizados, um artigo de revisão foi publicado por Wilson e col. foi publicado. O sistema BioArgos (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, França) também utiliza a detecção de CO_2 por espectrofotometria de infravermelho, mas a leitura é através do vidro dos frascos. Esse procedimento não invasivo eliminava as desvantagens relacionadas com a metodologia invasiva acima mencionada para o BACTEC 660, 730 ou 860. Estritamente falando, esse sistema não é um sistema de monitoramento contínuo, uma vez que vários frascos têm que ser transferidos regularmente por um braço motorizado até uma unidade de leitura comum. Sistemas de monitoramento contínuo usam unidades de detecção separadas para cada frasco individualmente.

SISTEMAS DE HEMOCULTURAS DE MONITORAMENTO CONTÍNUO

Um grande avanço nos sistemas de cultura de sangue automatizados foi a introdução dos sistemas de monitoramento contínuo. Esses instrumentos compartilham as virtudes de serem incubadoras possuindo mecanismos de agitação e detecção em unidades integradas, reduzindo o tempo de tratamento, uma vez que os frascos foram carregados; são também sistemas fechados e não invasivos, reduzindo a contaminação cruzada e sem a necessidade da coleta de amostra de gás separadamente ou necessitando da esterilização de agulhas; monitoramento contínuo de garrafas a cada 10 a 25 min, fazendo com que o crescimento microbiano seja detectado mais rapidamente. Inúmeros trabalhos mostram as vantagens dessas metodologias, e a escolha do equipamento, em geral, está mais relacionada ao custo do equipamento e/ou de seus frascos de consumo. Seguem alguns dos benefícios: contínuo monitoramento pelo sistema (leitura em minutos); maior sensibilidade e rapidez para detecção de positividade da amostra (agitação); possibilidade de criação de banco de dados dos microrganismos isolados e dados demográficos, além da interface com o sistema do laboratório, o que facilita a liberação dos resultados negativos; determinação do tempo para positividade de cada frasco, auxiliando no diagnóstico de infecções relacionadas a cateter; menor risco de contaminação laboratorial, pois o repique só é realizado em amostras positivas; não é necessário repicar amostra negativa; economia de tempo e material (agulha, seringa e placas com meios de cultura para repiques) com menor risco de manipulação; os frascos de plástico possuem a vantagem de serem mais leves e provocarem menos risco de acidentes.

SISTEMA BACT/ALERT 3D

O Sistema BacT/Alert 3D (Biomerieux – França) foi o primeiro sistema de monitoramento contínuo a receber a aprovação do FDA (Food and Drug Administration) em 1990. Baseia-se na detecção colorimétrica da concentração de CO_2 por meio de um sensor instalado internamente ao fundo de cada garrafa. Uma membrana permeável somente ao CO_2 separa o sensor do líquido contido nos frascos. Durante o metabolismo microbiano, o CO_2 aumenta sua concentração no meio, que difunde para o sensor, causando a acidificação e mudança na cor do sensor de verde para amarelo. A cada 10 min, diodos emissores de luz no sensor e fotodiodos medem a quantidade de luz vermelha refletida a partir do sensor, que é proporcional à cor do sensor, a qual por sua vez é proporcional a concentração de CO_2. Cada célula que recebe um frasco no instrumento BacT/Alert (Figura 42.1) contém sua unidade de detecção. As unidades de reflectância geradas são transferidas para o microcomputador, que reconhece culturas positivas por meio da análise de algoritmos baseados em critérios diferentes, com leitura inicial superior a um limiar predefinido, aumento linear ou aumento sustentado da taxa de produção de CO_2. Os Frascos BacT/Alert contêm 40 mL de meio de cultura e podem aceitar até 10 mL de amostra de sangue, com exceção do frasco pediátrico Pedi-BacT (até 4 mL de sangue). Um período de incubação de 5 dias foi determinado como sendo aceitável para esse sistema, devido à rápida detecção de culturas positivas clinicamente relevantes. O suplemento Ecosorb® (carvão ativado e terra de Fuller), que complementa o caldo BHI para o BacT/Alert FAN, aumentou significativamente o rendimento em relação ao meio padrão, especialmente para pacientes que receberam terapia antimicrobiana quando o sangue foi colhido na vigência de antibióticos. Recentemente foi lançado na Europa um novo modelo do BacT/Alert chamado VIRTUO. Este modelo traz novas características como: carregamento e descarregamento automatizado dos frascos; leitor de código de barras em 360º; verificação automática do volume de sangue colhido por frasco e tela *touchscreen* intuitiva dos principais comandos.

SÉRIE BACTEC 9000

Os Sistemas BACTEC 9120 e 9240 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Maryland, USA) receberam a aprovação do FDA em 1992, e as capacidades de 120 (Figura 42.1) e 240 frascos são a única diferença entre os dois instrumentos, sendo o sistema 9050 (com capacidade para até 50 frascos), introduzido depois. Esses sistemas são semelhantes ao BacT/Alert, detectando a produção de CO_2 com sensores fluorescentes ligados ao fundo de cada frasco em vez do sensor colorimétrico do sistema BacT/Alert. Todas as células dos blocos em que os frascos na incubadora são carregados contêm um dispositivo de monitorização de fluorescência composto por diodos emissores de luz e um detector de fotodiodo. O instrumento determina a fluorescência de cada garrafa a cada 10 min e encaminha os valores para o computador. Como as concentrações de CO_2 aumentam durante o crescimento microbiano, a fluorescência do sensor aumenta, e o instrumento reconhece culturas positivas por algoritmos de computador ou valores δ. Uma grande variedade de meios

está disponível para esses instrumentos. Os frascos com meio de cultura BD BACTEC™ aeróbio, anaeróbio e pediátrico (Figura 42.2) contêm resinas inibidoras de antibióticos (meios PLUS). O sistema também oferece frasco com meio de cultura diferenciado para recuperação de micobactérias e fungos em amostras de sangue e de outros líquidos corporais estéreis (BD BACTEC™ Myco F Lytic). Estão disponíveis também frascos sem inibidores de antibióticos (BD BACTEC™ Standard). Todos os frascos BD BACTEC™ não necessitam de ventilação e permitem o uso de sistema de coleta fechada BD Vacutainer® (*holder* de uso único e BD Vacutainer® scalp Safety-Lok™ de 12"). O scalp possui dispositivo de segurança para ser ativado logo após o uso, diminuindo o risco de acidentes com perfurocortantes envolvendo profissionais da saúde. O emprego do sistema de coleta fechada para hemocultura também reduz a probabilidade de contaminação da amostra. Recentemente o sistema BACTEC foi atualizado para um novo modelo: BACTEC FX (Figura 42.3). A metodologia de detecção é a mesma e utiliza os mesmos frascos e meios de cultura, porém, agora, os frascos são de plástico e não mais de vidro. Além disso, houve uma melhora no fluxo de trabalho e na ergonomia do equipamento com um *design* compacto e modular.

Figura 42.1 Equipamento *all in one* para extração, amplificação e detecção de patógenos e genes de resistência – PCR Automatizado (Sistema BD-MAX®).
Fonte: Becton Dickinson -BD

Microflex® (BD)

Vitek-MS® (Biomerieux)

Figura 42.3 Equipamentos de MALDI-TOF disponíveis no Brasil.
Fonte: Becton Dickinson e LACEN/PR

SISTEMA VERSATREK

O sistema automatizado VersaTREK (Thermo Fischer Scientific Inc, Massachusetts, USA) é a versão evoluída que substituiu o Sistema ESP DIFCO cultura II, que foi introduzido no mercado em 2003. A detecção de hemoculturas positivas pelo VersaTREK (Figura 42.1) é baseada na medição de alterações de pressão no espaço livre do gargalo do frasco (devido ao consumo e/ou produção de gás pelo micro-organismo) por meio de um sensor de pressão externo. Esse monitoramento é feito a cada 24 minutos. Este sistema não é limitado a microrganismos que produzem concentrações baixas de CO_2, uma vez que ele detecta qualquer gás produzido. Outras diferenças entre os sistemas incluem a composição dos meios de cultura, a concentração ou o tipo de anticoagulante e o volume do meio de cultura nos frascos. Além disso, o frascox aeróbio VTI utiliza uma barra de agitação interna, que cria um vórtice no interior do frasco, ao passo que o frasco anaeróbio não é nem agitado. Este procedimento difere de outros sistemas, que usam um movimento de balanço contínuo para todos os frascos. O sistema VersaTREK pode ser

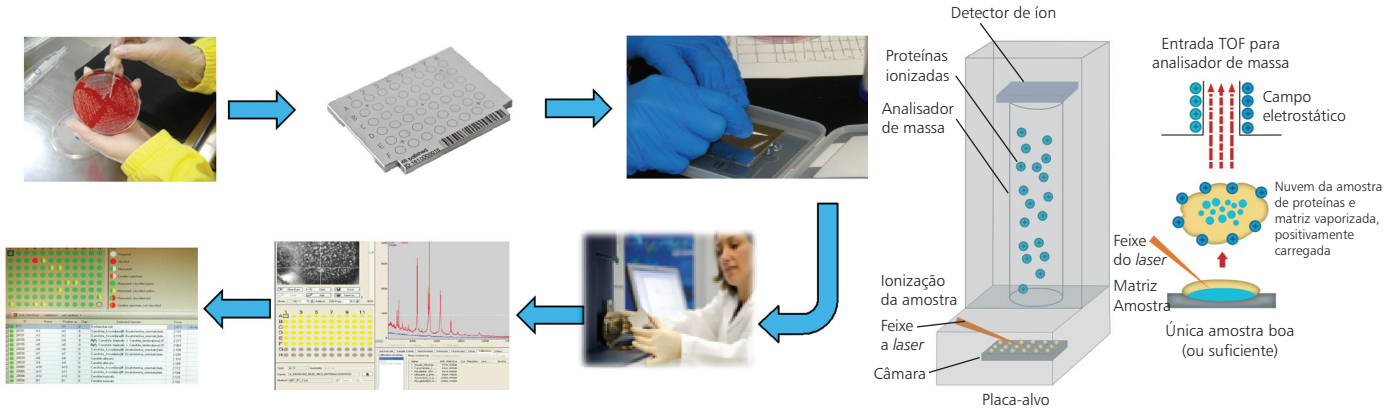


Figura 42.2 Etapas necessárias para identificação bacteriana através do MALDI-TOF e princípio do método.
Fonte: Adaptada de Patel, Robin. "MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases." Clinical chemistry 61.1 (2015): 100-111.

adaptado para acomodar volumes pequenos ou grandes de hemoculturas e, com a capacidade de 96 garrafas, é ideal para laboratórios menores. Esse sistema tem também a vantagem de utilizar pequenos volumes de sangue a partir de 0,1 mL até 10 mL. Com 80 mL de meio em cada frasco, cria-se uma relação ótima do sangue/meio de 1:9 a minimizar, por diluição, o efeito dos fatores antimicrobianos do soro do paciente e dos antibióticos.

Métodos moleculares de detecção automatizada de microrganismos

Com o uso cada vez mais amplo dessa tecnologia, que era inicialmente usada apenas em pesquisa e depois tornou-se uma ferramenta de diagnóstico, a indústria de diagnóstico *in vitro* desenvolveu nos últimos anos uma série de kits para pesquisa de patógenos, contendo sistemas completos para esse fim. Embora os sistemas prontos para uso tenham um custo mais elevado, apresentam uma série de vantagens, como maior padronização, praticidade dos testes, uso de controles internos, entre outros. Embora as técnicas de PCR (Proteína C Reativa) convencional tenham trazido grande avanço para a detecção de patógenos em Microbiologia, esse método se adequava melhor às investigações em pesquisas científicas ou a pequenas rotinas. Laboratórios de grande porte e com um volume elevado de amostras a serem processadas sempre tiveram dificuldades em implantar as pesquisas de patógenos por PCR. Entretanto, nos últimos 10 anos, várias técnicas inovadoras de PCR foram desenvolvidas, as quais permitem a detecção do material genético amplificado durante o processo e não somente ao final de 35 a 40 ciclos. Por isso, essa metodologia ficou conhecida como PCR em Tempo Real ou *Real Time* PCR e, mais recentemente, qPCR. Essa tecnologia conferiu ao sistema características fundamentais para seu uso de rotina: é mais rápido, menos trabalhoso, mais sensível e o risco de contaminação cruzada é menor quando comparado ao PCR convencional.

Portanto, o método de qPCR mostrou-se mais adequado a pequenas e grandes rotinas e deu um novo impulso ao uso de métodos moleculares para detecção de patógenos em laboratórios clínicos. Em nossa experiência, no Laboratório Central de Saúde Púbica do Paraná (LACEN/PR), foi possível implantar a pesquisa do vírus H1N1 durante a pandemia de 2009 pelo método de PCR em tempo real, o que possibilitou a execução de mais de 500 testes diários no pico da epidemia, superando a marca de 15.000 testes em apenas seis meses.

Atualmente várias companhias líderes no mercado de diagnóstico e pesquisa molecular oferecem plataforma de PCR em Tempo Real. Entre esses equipamentos, podemos citar alguns como o 7.500 e o Via 7, da Thermo/Life Technologies®; os modelos Light Cycler®, da Roche; o Easy Q®, da Biomerieux; o ddPCR®, da Biorad, e o Rotor-Gene, da QiaGen®. Uma revisão abrangente das metodologias, equipamentos, seus prós e contras pode ser acessada em literaturas específicas sobre o tema e também no Capítulo 40.

Outro avanço significativo na área molecular automatizada tem sido o uso de métodos multiplex. Na detecção direta de patógenos de uma amostra, podemos ter diversas suspeitas clínicas; no PCR convencional ou mesmo no qPCR *simplex* um único par de *primers* é utilizado por vez. Portanto, em uma suspeita de infecção pulmonar (p. ex.: pneumonia atípica), teríamos que investigar a presença de *Legionella pneumophila, Chlamidophylla pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae* e ainda alguns vírus. Para pesquisar oito desses patógenos, teriam que ser realizadas oito reações individuais de PCR ou de qPCR, uma para cada espécie. Para a mesma pesquisa por PCR Multiplex podem ser pesquisados até quatro patógenos por reação, sendo necessárias apenas duas reações para uma investigação completa. Um dos mais recentes avanços dessa tecnologia multiplex tem sido o desenvolvimento de plataformas *all-in-one,* que realizam todas as etapas necessárias para uma reação de PCR em Tempo Real, desde a extração direta da amostra clínica até a detecção, incluindo todas as etapas de pipetagem, purificação e incubação, de maneira automatizada (vide Figura 42.1). Esse tipo de plataforma foi recentemente lançada no Brasil (Sistema BD-MAX® – Becton e Dickinson, Maryland, USA) e, embora poucos kits ainda tenham sido lançados no mercado, já é possível realizar a pesquisa multiplex de genes codificantes das enzimas do tipo carbapenemase mais frequentes no mundo (KPC, NDM e OXA-48) em pouco mais de 120 minutos, sendo necessária como etapa manual apenas a introdução da amostra no tubo de extração. Uma das principais vantagens desse tipo de equipamento é a sua versatilidade em relação à rotina, pois permite que sejam processadas de uma a 24 amostras, conforme a demanda do laboratório. Outras pesquisas já disponíveis no Brasil na forma de reagentes prontos para o uso, por qPCR automatizado são: pesquisa de toxina de *Clostridium difficile,* pesquisa de *S. aureus MRSA,* pesquisa multiplex de enteropatógenos (*Salmonella, Shigella, Campylobacter* e *Shiga toxin* 1 e 2) e pesquisa de *Streptococcus agalactiae*. Em nossa experiência em laboratório de saúde pública, essa metodologia demonstrou ter sensibilidade e especificidade equivalentes a protocolos de qPCR não automatizados do CDC (*Center for Diseases Control and Prevention*) para a pesquisa de carbapenemases, com a vantagem de ter um tempo total de manipulação pelo operador de menos de 15 minutos para processar 24 amostras.

MALDI-TOF

Matrix-assisted laser desorption/ionization

Na última década, as ferramentas moleculares para a identificação de microrganismos têm tido grandes avanços. Além disso, o surgimento de sistemas comerciais que facilitam o uso desses métodos tornam estes cada vez mais acessíveis. Dentre as principais ferramentas utilizadas, a plataforma de Espectrometria de Massa modificada – MALDI-TOF-MS (*Matrix-assisted laser desorption ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry*) – foi amplamente avaliada e apresentou excelente *performance* na identificação de variados grupos de microrganismos.

Essa metodologia, além de apresentar grande especificidade, tem como principais vantagens o custo reduzido e uma significativa rapidez (2 a 3 minutos) em relação a outros métodos de identificação bacteriana, como a automação (4 a 6 horas) e métodos manuais ou sequenciamento (24 a 48 horas).

O MALDI-TOF-MS tem sido proposto como um novo método para substituir o sequenciamento genético e a identificação bioquímica automatizada e convencional.

Histórico

A Microbiologia Clínica, em especial a Bacteriologia Clínica, se desenvolveu lentamente nos últimos cento e cinquenta anos. Métodos e técnicas estabelecidos no século XIX, na época de Pasteur e Koch, estão sendo utilizados até os dias de hoje por muitos laboratórios. Esses métodos, baseados no crescimento *in vitro* de microrganismos, são as principais ferramentas para identificar a espécie bacteriana e determinar a suscetibilidade a antibióticos.

Além disso, técnicas descritas no século XVII, como a microscopia ótica, são ainda muito utilizadas em laboratórios de Bacteriologia, e a coloração de Gram continua sendo a principal ferramenta para a diferenciação rápida de bactérias patogênicas.

Na maioria dos laboratórios de Bacteriologia, o fluxo de trabalho é em grande parte artesanal. A partir da amostra clínica, é realizada a microscopia e a semeadura em ágar. Após 24 a 48 horas de incubação, o microrganismo se desenvolve. Então são realizadas provas rápidas (catalase, oxidase, Gram) que podem auxiliar na identificação presuntiva. Depois disso, as colônias são submetidas a uma série de provas bioquímicas (manuais ou automatizadas) que caracterizam a espécie bacteriana isolada e, paralelamente, é determinada a sensibilidade a antibióticos.

Somente nas últimas três décadas surgiram testes diagnósticos mais modernos, como a pesquisa de microrganismos por meio do uso de anticorpos monoclonais espécie-específicos e testes moleculares para a detecção de bactérias diretamente da amostra clínica. Apesar de estas técnicas já estarem disponíveis há mais de 20 anos, a sua aplicação ainda é muito voltada à pesquisa ou restrita aos laboratórios clínicos de grande porte.

Embora já tenham sido publicados trabalhos que utilizam instrumentos de espectrometria de massa para identificar microrganismos desde a década de 1970, esta metodologia não foi aplicada em laboratórios de rotina até recentemente. O primeiro sistema proposto para a identificação de bactérias foi a pirólise associada à espectrometria de massa (PyMS), descrito pela primeira vez em 1975 por Anhalt & Fenselau. Porém esse sistema não se mostrou adequado para a rotina laboratorial. Logo depois, foi descrito o uso da ionização a *laser* para provocar a dessorção de células ou LDMS. O termo MALDI – *Matrix-assisted laser desorption ionization* – foi utilizado pela primeira vez por Karas & Hillenkamp, em 1985, que descreveram o uso de uma matriz – como um ácido orgânico forte – para tornar o processo de ionização menos agressivo. Posteriormente, em 1996, foi descrito por Holland e col. o uso de um método que permitiu a aplicação de células intactas na análise espectrométrica. Os resultados dessa pesquisa tornaram o método aplicável à rotina laboratorial.

Com o aprimoramento do método, as biomoléculas (proteínas e peptídeos) carregadas passam a ser separadas em um tubo à vácuo. A continuidade dos estudos e a evolução da espectrometria de massa durante as décadas de 80 e 90, possibilitaram cada vez mais o uso desse método de rotina. Na verdade, desde 2006, Alvin Fox afirmava que havia diversas aplicações que justificavam o amplo uso do MALDI-TOF em laboratórios clínicos.

A partir de 2011, observou-se um aumento expressivo de publicações sobre MALDI-TOF-MS que verificaram a eficácia deste método na identificação rápida de diversos grupos de microrganismos. Atualmente, no mercado brasileiro, existem dois equipamentos disponíveis (vide Figura 42.2). O desempenho dessa técnica é comparável ao sequenciamento genético de 16S rDNA, que é o padrão-ouro para identificação bacteriana. Com a ampla utilização desse método, diversas outras aplicações para o MALDI-TOF foram estabelecidas. Dentre estas, encontram-se a detecção direta de microrganismos de amostras clínicas; a diferenciação de cepas em subtipos, a tipagem molecular e análise clonal; a detecção de mecanismos de resistência e a detecção de micro-organismos de difícil isolamento.

A identificação bacteriana em larga escala, em menor tempo (poucos minutos) e com custo reduzido pode trazer uma revolução no paradigma dos exames microbiológicos; classicamente definidos como de alto custo e demorados. Além disso, a possibilidade de tipificação molecular desses microrganismos, com uma redução ainda mais significativa nos custos e em velocidade incomparável com os métodos tradicionais, é uma ferramenta de grande valia, especialmente se utilizada no conceito de controle e prevenção das infecções relacionadas à assistência em saúde.

Princípio da metodologia

A técnica envolvida na identificação por MALDI-TOF é extremamente simples: uma pequena porção da colônia isolada é colocada em um *spot* do *slide* e, em seguida, um microlitro de matriz (ácido hidroxicinâmico) é adicionado ao *spot*. Após a secagem do *slide*, o mesmo é colocado na bandeja do equipamento. No interior do espectrômetro, um raio *laser* é aplicado à amostra do *slide*. Esta amostra absorve grande quantidade de energia e as moléculas bacterianas são instantaneamente ionizadas. Logo na sequência, um tubo a vácuo carregará essas moléculas de acordo com o seu peso molecular e sua carga. De acordo com os diferentes tempos de voo nessa câmara (*Time of Flight*), as moléculas chegarão ao espectrômetro (MS) em momentos diferentes e produzirão sinais (picos) detectados pelo equipamento e registrados na forma de picos de espectrometria – o espectrograma (Figuras 42.2 e 42.4). A maioria dos sinais produzidos são decorrentes da ionização de proteínas ribossomais.

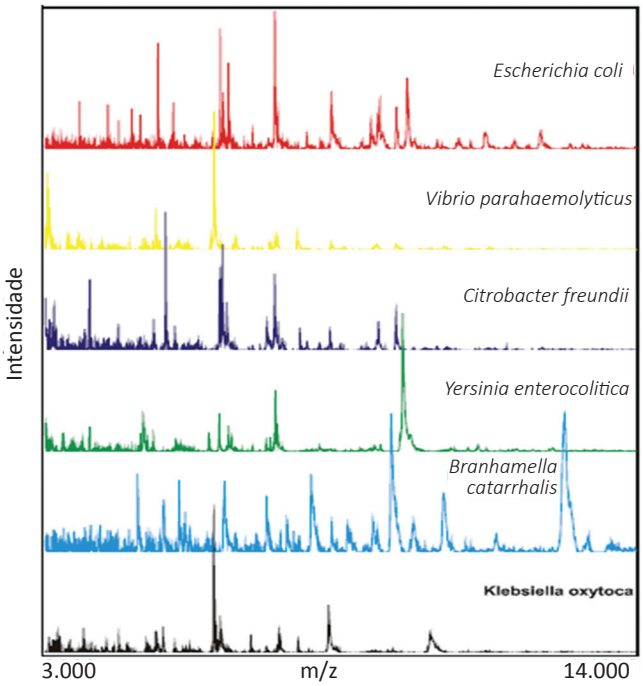


Figura 42.4 Comparação de diferentes espectrogramas de isolados bacterianos diversos.
Fonte: Modificado de bioMerieux

Análise dos Espectros para Identificação

Como cada bactéria possui uma composição específica de proteínas, produzirá um espectrograma típico de sua espécie. Esse espectrograma é comparado a uma base de dados que contém milhares de espectrogramas de centenas de diferentes espécies. Desta maneira, o equipamento atribui a identificação do isolado desconhecido pela semelhança do espectrograma gerado com os armazenados no banco de dados.

SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

Dentre as principais metodologias utilizadas na identificação bacteriana, o sequenciamento genético do gene 16S rRNA (ou 16S rDNA) tem se mostrado uma das ferramentas mais aplicáveis para o diagnóstico laboratorial de rotina.

A metodologia de sequenciamento de DNA foi originalmente descrita por Sanger e colaboradores em 1977. Desde então, este método foi se tornando cada vez mais utilizado em inúmeras pesquisas na área de Microbiologia, até que recentemente tem sido incorporado pelos laboratórios de rotina. Nesse contexto, o desenvolvimento de equipamentos que realizam a eletroforese automatizada (Analisadores Genéticos) deu um grande impulso à área, tornando a metodologia mais prática e mais adaptável ao uso de rotina, bem como permitindo uma identificação mais acurada e a descrição de novas espécies bacterianas.

O sequenciamento do gene 16S rRNA é um dos mais utilizados quando se deseja identificar bactérias com fenótipos atípicos, microrganismos de crescimento lento, bactérias não cultiváveis ou culturas negativas.

Histórico

Um dos primeiros pesquisadores a utilizar o gene 16S rDNA com a finalidade de estudar bactérias foi Carl Woese, em 1977, que depois consolidou a divisão dos seres vivos em Domínios, a partir das diferenças do 16S rDNA. Entretanto, esses estudos pioneiros eram direcionados à filogenética de microrganismos.

Na década de 1980 e 1990, o uso do gene 16S rRNA tornou-se mais popular entre pesquisadores, mas foi a partir do século XXI que essa metodologia ganhou um uso mais amplo nos laboratórios de rotina, especialmente após o desenvolvimento de *kits* comerciais para determinar a sequência parcial ou total desse gene (Microseq 500® e Microseq Full Gene® – Life Technologies, Foster City – California, USA).

Características

O gene 16S rRNA tem algumas peculiaridades interessantes que justificam seu uso para identificação bacteriana: tem um comprimento longo (1550 pares de base) que possui uma região conservada (as iniciais e finais) e outras muito variadas (as intermediárias); possui um polimorfismo entre espécies suficiente para permitir a diferenciação entre estas. Devido a essas características, podemos usar um par de *primers* universais – um para o início do gene e outro para a região em torno de 540 pb ou no seu final (1550 pb). Geralmente não é necessário realizar o sequenciamento do gene completo para a maioria dos isolados clínicos, sendo suficiente a determinação dos primeiros 500 pares de base.

Execução do método

De maneira simplificada, podemos descrever o método do sequenciamento em 9 passos, sendo a maioria deles comum às técnicas convencionais de um PCR; são eles: extração do DNA, amplificação do *template,* detecção do *amplicon*, purificação do *amplicon,* reação de sequenciamento, purificação do produto de sequenciamento e, por último, a eletroforese capilar automatizada (Figuras 42.5 e 42.6). Esse processo todo leva em torno de 34 horas ou 4 períodos integrais de trabalho.

Interpretação do método

Depois das etapas descritas antes, a sequência de DNA obtida é exportada para *softwares* de análise ou para um banco de dados *on-line*. Dentre estes, cabe destacar o Gene Bank, através do browser BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), ou o Le BIBI (https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi) e, ainda, o Sepsi-Test Blast (http://www.sepsitest-blast.de/en/index.html). Cada um desses bancos tem suas vantagens e desvantagens, sendo o Gene Bank o maior de todos, o Le BIBI mais voltado para os isolados clínicos e o Sepsi-test específico para isolados de septicemia.

Figura 42.5 Etapas do método de sequenciamento do 16S rDNA.
Fonte: Pillonetto, M. Sequenciamento genético do 16S rDNA

ABI 3130® (Thermo/Life Technologies)

ABI 3500® (Thermo/Life Technologies)

Figura 42.6 Analisador genético automatizado e analisador genético de última geração (*Next Generation Sequencing*).
Fonte: Thermo Fisher Scientific

Interpretação dos resultados do sequenciamento

A identificação do 16S rDNA não é inquestionável, pois apresenta limitações, como a dificuldade de separar certos grupos de bactérias, como as do complexo *Burkholderia cepacia*, complexo *Acinetobacter baumannii*, complexo *Mycobacterium tuberculosis*, entre outros. Porém, é considerada atualmente o *gold standard* entre todas as metodologias de identificação. Entre os anos de 2001 e 2007, mais de 120 novas espécies bacterianas foram descritas a partir dos dados obtidos pelo uso do 16S rDNA.

Em nossa experiência prática, em torno de 10% das bactérias submetidas a métodos automatizados convencionais (Vitek 2®, Biomerieux – Marcy L'Etoile, França) têm que ser submetidas à confirmação por sequenciamento. A maioria dessas análises leva a identificação de microrganismos raros como *Aquamicrobium lusatiense*, *Pandorea sputorum*, *Dysgonomas capnocytophagoides*, *Morococcus cerebrosum*, *Gordonia polyisoprenivorans*, entre outros. Estes microrganismos não constam da base de dados da maioria dos métodos automatizados, inclusive do MALDI-TOF.

Dentre as principais limitações desse método, está o fato de ele não ser totalmente automatizado e precisar de no mínimo 3 dias para se obter resultados. Entretanto, essas dificuldades devem ser superadas a partir da popularização do uso dos equipamentos de sequenciamento de última geração – *Next Generation Sequencing* (*Ion Torrent Personal Genome Machine*®, Life Technologies, Foster City – California, USA) –, que devem reduzir o prazo necessário para o sequenciamento de múltiplos genes *housekeepers* ou até mesmo do genoma bacteriano completo para apenas duas horas (vide Figura 42.7). Estes métodos iniciarão uma nova revolução em Microbiologia que introduzirá termos como resistoma e toxoma na microbiologia clínica dos próximos anos.

Figura 42.7 Analisador genético de última geração (*Next Generation Sequencing*).
Fonte: Ion Torrent PGM® (Thermo/Life Technologies).

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Abele-Horn M, Hommers L, Trabold R, et al. Validation of VITEK 2 version 4.01 software for detection, identification, and classification of glycopeptide-resistant enterococci. J Clin Microbiol. 2006;44:71-6.
2. Adlassnig KP, Blacky A, Koller W. Artificial-intelligencebased hospital-acquired infection control. Stud Health Technol Inform. 2009;149:103-10.
3. Aissa N, Stolar D, Legrand P. Accuracy of four agar diffusion methods and the Vitek 2 automated system for the detection of the methicillin resistance in coagulase negative staphylococci. Pathol Biol (Paris). 2004;52:26-32. (In French.)
4. Aldridge KE, Janney A, Sanders CV, et al. Interlaboratory variation of antibiograms of methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus strains with conventional and commercial testing systems. J Clin Microbiol. 1983;18:1226-36.
5. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JKL, et al. Evaluation of methods to identify the Klebsiella pneumoniae carbapenemase in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2007;45:2723-5.
6. Andes D, Craig WA. Treatment of infections with ESBLproducing organisms: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Clin Microbiol Infect. 2005;11(Suppl. 6):10-7.
7. Andrews JM, Boswell FJ, Wise R. Evaluation of the Oxoid Aura image system for measuring zones of inhibition with the disc diffusion technique. J Antimicrob Chemother. 2000;46:535-40.
8. Andrzejewska E, Szkaradkiewicz A, Kaniasty M. Sensitivity to selected beta-lactam antibiotics of clinical strains of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. Med Dosw Mikrobiol. 1998;50:197-205
9. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. Anal Chem Am Chem Society. 1975 Feb;47(2):219-25.
10. Aronsky D, Haug PJ. Diagnosing community-acquired pneumonia with a Bayesian network. Proc AMIA Symp. 1998:632-6.
11. Banoo S, Bell D, Bossuyt P, et al. TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. Nat Rev Microbiol. 2006;4:S20-S32.
12. Barry J, Brown A, Ensor V, et al. Comparative evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System (AES) in five UK hospitals. J Antimicrob Chemother. 2003;51:1191-202.
13. Batista N, Fernandez MP, Lara M, et al. Evaluation of methods for studying susceptibility to oxacillin and penicillin in 60 Staphylococcus lugdunensis isolates. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27:148-52.
14. Behera B, Mathur P. Erroneous reporting of vancomycin susceptibility for Staphylococcus spp. by Vitek software version 2.01. Jpn J Infect Dis. 2009;62:298-9.
15. Bellamy JE. Medical diagnosis, diagnostic spaces, and fuzzy systems. J Am Vet Med Assoc. 1997;210:390-6.
16. Bemer P, Juvin ME, Corvec S, et al. Correlation of agar dilution and VITEK2 system for detection of resistance to macrolides, lincosamides and pristinamycin among Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis: association with genotypes. Clin Microbiol Infect. 2005;11:656-61.
17. Benagli C, Rossi V, Dolina M, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Clinically Relevant Bacteria. Ahmed N, editor. PLoS One. 2011 Jan 25;6(1):e16424.
18. Berktas M, Yaman G, Ozturk O. vanC gene-related intrinsic teicoplanin resistance detected in Enterococcus casseliflavus and E. gallinarum strains by the BD Phoenix automated microbiology system. J Clin Microbiol. 2008;46:2466.
19. Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, et al. Biotyping of multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. PLoS One. 2013 Jan;8(4):e61428.
20. Bert F, Juvin M, Ould-Hocine Z, et al. Evaluation and updating of the Osiris expert system for identification of Escherichia coli beta-lactam resistance phenotypes. J Clin Microbiol. 2005;43:1846-50.
21. Bert F, Ould-Hocine Z, Juvin M, et al. Evaluation of the Osiris expert system for identification of beta-lactam phenotypes in isolates of Pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol. 2003;41:3712-8.
22. Bhat SV, Peleg AY, Lodise TP Jr, et al. Failure of current cefepime breakpoints to predict clinical outcomes of bacteremia caused by gram-negative organisms. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:4390-5.
23. Biswas S, Rolain J-M. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. J Microbiol Methods. 2013 Jan;92(1):14-24.
24. Bizzini A, Jaton K, Romo D, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. J Clin Microbiol. 2011 Feb;49(2):693-6.
25. Brisse S, Stefani S, Verhoef J, et al. Comparative evaluation of the BD Phoenix and VITEK 2 automated instruments for identification of isolates of the Burkholderia cepacia complex. J Clin Microbiol. 2002 May;40(5):1743-8.
26. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. J Clin Microbiol. 2011 Sep;49(9):3321-4.

27. Carbonnelle E, Nassif X. [Applications of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory]. Med Sci (Paris). 2011 Oct;27(10):882-8.
28. Charles L, Wilkins JOL. Identification of Microorganisms by Mass Spectrometry. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2005. p.352.
29. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI--TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev. 2012 Mar;36(2):380-407.
30. Demarco ML, Ford BA. Beyond identification: emerging and future uses for maldi-tof mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. Clin Lab Med. 2013 Sep;33(3):611-28.
31. Fernández-Olmos A, García-Castillo M, Morosini M-I, et al. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros. 2012 Jan;11(1):59-62.
32. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2010 Jun;48(6):2110-5.
33. Fournier PE, Drancourt M, Colson P, et al. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. Nat Rev Microbiol. 2013 Jul 16;11(8):574-85.
34. Fox A. Mass spectrometry for species or strain identification after culture or without culture: Past, present, and future. J Clin Microbiol. 2006 Aug;44(8):2677-80.
35. Fox GE, Magrum LJ, Balch WE, et al. Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 1977 Oct;74(10):4537-41.
36. Fredlund H, Falk L, Jurstrand M, et al. Molecular genetic methods for diagnosis and characterisation of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae: impact on epidemiological surveillance and interventions. APMIS. 2004;112(11-12):771–84.
37. Gouveia J, Castelhano A, Pillonetto M. Avaliação do desempenho da identificação manual e automatizada em relação ao sequenciamento do gene 16S rDNA em bactérias gram negativas atípicas. Paraná: PUCPR, 2013. p.19.
38. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, et al. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 1996 Jan;10(10):1227-32.
39. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. J Clin Microbiol. 2007 Sep;45(9):2761-4.
40. Jankowski EP, Fernandes KLM, Meira NVB, et al. Avaliação crítica da identificação de bactérias atípicas através de métodos avançados– comparação entre automação e sequenciamento genético do gene 16S rDNA. Paraná: PUCPR, 2013. p.27.
41. Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. Anal Chem. 1985 Dec;57(14):2935-9.
42. Kaufmann SHE, Schaible UE. 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. Trends Microbiol. 2005 Oct;13(10):469-75.
43. Kootallur BN, Thangavelu CP, Mani M. Bacterial identification in the diagnostic laboratory: how much is enough? Indian J Med Microbiol. 2011 Jan 1;29(4):336-40.
44. Lagacé-Wiens PRS, Adam HJ, Karlowsky JA, et al. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures using MALDI-TOF Mass Spectrometry and a commercial extraction system - Analysis of performance, cost and turnaround time. J Clin Microbiol. 2012 Aug 8;
45. Logan J, Edwards K, Saunders N. Real-Time PCR: Current Technology and Applications | Book [Internet]. Heal Prot Agency. 2009 [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.horizonpress.com/realtimepcr
46. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect. 2004 Mar;10(3):190-212.
47. Mellmann A, Cloud J, Maier T, et al. Evaluation of matrix--assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. J Clin Microbiol. 2008 Jun;46(6):1946-54.
48. Mencacci A, Monari C, Leli C, et al. Typing of nosocomial outbreaks of Acinetobacter baumannii by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2013 Feb;51(2):603-6.
49. Moyes RB, Reynolds J, Breakwell DP. Differential staining of bacteria: gram stain. Curr Protoc Microbiol. 2009 Nov;Appendix 3:Appendix 3C.
50. Risch M, Radjenovic D, Han JN, et al. Comparison of MALDI TOF with conventional identification of clinically relevant bacteria. Swiss Med Wkly. 2010 Jan;140(September):w13095.
51. Sandrin TR, Goldstein JE, Schumaker S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. Mass Spectrom Rev. 2013;32(3):188-217.
52. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 1977 Dec;74(12):5463-7.
53. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 1977 Dec;74(12):5463-7.
54. Stager CE, Davis JR. Automated systems for identification of microorganisms. Clin Microbiol Rev. 1992 Jul;5(3):302-27.
55. Steingart KR, Henry M, Laal S, et al. Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. PLoS Med. 2007 Jun;4(6):e202
56. Toledo PVM, Arend LN, Pilonetto M, et al. Surveillance programme for multidrug-resistant bacteria in healthcare-associated infections: an urban perspective in South Brazil. J Hosp Infect. 2012 Apr;80(4):351-3.
57. Van Belkum A, Durand G, Peyret M, et al. Rapid clinical bacteriology and its future impact. Ann Lab Med. 2013 Jan;33(1):14-27.
58. Van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J Clin Microbiol. 2010 Mar;48(3):900-7.
59. Wang J, Zhou N, Xu B, et al. Identification and cluster analysis of Streptococcus pyogenes by MALDI-TOF mass spectrometry. PLoS One. 2012 Jan;7(11):e47152.
60. Wang YR, Chen Q, Cui SH, et al. Characterization of Staphylococcus aureus Isolated from Clinical Specimens by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. Biomed Environ Sci. 2013 Jun;26(6):430-6.
61. Woese CR, Kandlert O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 1990;87(June):4576-9.
62. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. Clin Microbiol Infect. 2008 Oct;14(10):908-34.

43

capítulo

Marinês Dalla Valle Martino ▪ Paula Koga ▪ Itacy Siqueira

Controle de Qualidade

INTRODUÇÃO

A garantia dos procedimentos laboratoriais está apoiada na execução e desempenho do Controle de Qualidade. Esse controle pode ser interno ou externo, cujo melhor termo de uso é Avaliação Externa da Qualidade (AEQ).

O Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) utiliza o termo AEQ como sinônimo para "Ensaio de Proficiência", enquanto a ANVISA/REBLAS ainda utiliza o termo "Ensaio de Proficiência".

A AEQ é feita através da participação em Ensaios de Proficiência disponíveis para os diferentes procedimentos realizados. Para a microbiologia estão disponíveis programas através do PNCQ (Programa Nacional de Controle de Qualidade), patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC), PELM (Programa de Excelência para Laboratórios Médicos) ligado à Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (SBPC-ML) e gerenciado pela empresa Control Lab e o CAP (Colégio Americano de Patologia).

A participação na AEQ é também uma exigência da ANVISA e deve constar para todos os procedimentos disponíveis pelo laboratório.

Ocorre que, para certos procedimentos, não é possível encontrar nenhum provedor de controles. Especialmente na microbiologia, essa dificuldade está atrelada à viabilidade e ao risco biológico do transporte de certas amostras. Para tanto, são também aceitas outras possibilidades de AEQ que incluem a troca de amostras entre os laboratórios, divisão da amostra para realização por diferentes metodologias ou diferentes analistas.

Constam como objetivos da AEQ:

- padronizar a fase analítica de acordo com a literatura;
- avaliar a eficiência do controle interno da qualidade;
- avaliar e monitorar o desempenho do laboratório em ensaios específicos;
- identificar acertos e conformidades;
- identificar oportunidades de melhoria, ações corretivas e preventivas;
- indicar a exatidão analítica e garantir a confiabilidade dos resultados;
- elaborar material didático sobre assuntos técnico-científicos, administrativos ou de controle da qualidade para auxiliar o laboratório participante na sua educação continuada.

A principal premissa da AEQ é que a amostra deve ser processada exatamente como se fosse uma amostra de paciente, pelos mesmos analistas que participam da rotina e com o mesmo nível de complexidade no resultado, o que quer dizer que o resultado do teste de proficiência não pode ser mais específico que aquele que é entregue ao paciente

O controle interno de qualidade (CQI) refere-se à utilização de uma amostra conhecida da qual já se sabe o resultado esperado. Também deve existir para todos os procedimentos e sua frequência varia de acordo com o tipo de controle.

Os resultados do controle interno dos diferentes procedimentos devem estar descritos e documentados. Ainda, devem ser avaliados e assinados pelo menos mensalmente pelo diretor do laboratório ou pessoa designada por ele.

No caso do CQI apresentar-se não conforme, é mandatório ao laboratório:

- analisar o erro, instituir medidas corretivas ou suspender o teste, fazer a rastreabilidade de todos os resultados compreendidos entre o último CQI e o atual e retificar os laudos quando necessário.

A seguir, serão pontuadas as principais recomendações relacionadas ao controle de qualidade segundo a literatura e os principais órgãos certificadores.

- **Coloração:** o controle de qualidade da coloração de Gram, que é a mais utilizada na rotina de microbiologia, deve ser feito pelo menos semanalmente (desejável diariamente) e a cada novo lote de reagentes para micro-organismos Gram-positivos e negativos. Para serviços em que essa rotina é realizada com menos frequência, o controle deve ser feito no dia do teste.
  Para as outras colorações, por exemplo a coloração de Ziehl-Neelsen, o controle também deve ser realizado a cada dia de teste e a cada novo lote e remessa de reagentes, utilizando controle de qualidade positivo e negativo.

Para as reações de fluorescência, exige-se esse controle em toda a rotina.

No Quadro 43.1, pode-se observar um exemplo de planilha utilizada para controle de coloração e que pode ser adaptada a outros controles internos do laboratório.

- **Controle de coloração entre os observadores** (Gram, Ziehl-Neelsen e outras que o laboratório disponibiliza)**:** por meio do uso de microrganismos com coloração conhecida, microscópio de várias cabeças, imagens digitais ou microfotografias, pelo menos anualmente, deve-se avaliar o desempenho dos colaboradores. Também é considerado importante estabelecer controle com lâminas da rotina, em que são quantificados micro-organismos e elementos celulares para se avaliar o nível de concordância entre os observadores.
- **Meios de cultura:** para meios adquiridos, o documento M22-A3 do CLSI faz uma distinção em dois grupos: aqueles para os quais o certificado de qualidade enviado pelo fornecedor é válido e aqueles para os quais o certificado não é válido.

  De qualquer forma, toda nova entrega deve passar por uma inspeção visual que avalia a ausência de quebra da placa, integridade da embalagem, contaminação, aparência de descongelamento ou superaquecimento.

  Para meios prontos que necessitam de validação (os mesmos testes são aplicados para meios preparados no próprio laboratório), recomenda-se medir a esterilidade do meio, habilidade de permitir o crescimento de determinado patógeno em determinada concentração e, finalmente, a reatividade à provas bioquímicas a cada novo lote ou entrega.

  São considerados meios que não precisam de validação: ágar sangue, MacConkey, Mueller Hinton, Mueller Hinton sangue, azida, batata, Lowenstein-Jensen e Sabouraud.

  Devem ser validados no laboratório: ágar chocolate, ágar cromogênico (diferentes formulações), meio para anaeróbios (Anaerinsol®).
- **Provas bioquímicas**: incluindo as reações de catalase, coagulase, oxidase, indol, bacitracina, optoquina, antígeno de aglutinação dos estreptococos, ONPG, X, V devem ser testadas com controles positivos e negativos a cada novo número de lote e entrega dos reagentes. Uma sugestão é realizar diariamente as provas mais frequentes, como catalase, coagulase, oxidase, indol; semanalmente, a bacitracina, optoquina e o restante a cada novo lote.

Quadro 43.1 Planilha para acompanhamento do controle interno de coloração.

Controle diário dos corantes de Gram, Ziehl-Neelsen e tinta-da-china									
Gram-positivo: ATCC 29213 *Staphylococcus aureus*/Gram-negativo: ATCC 25922 *Escherichia coli*									
Ziehl-neelsen positivo: ATCC 35717 *M. avium*/ZIEHL-NEELSEN NEGATIVO: ATCC 25922 *Escherichia coli*									
Tinta da china: Positivo CAP-F09 – Negativo: ATCC 14053 *C. albicans*									
Frequência: Diária									
Mês:									
	Gram (Manual)		Gram (Automatizado)		Ziehl-Neelsen		Tonta-da-china		Liberado para uso
	S. aureus	*E. coli*	*S. aureus*	*E. coli*	*M. avium*	*E. coli*	*C. neoformans*	*C. albicans*	
Data	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
1									
2									
3									
4									
.... segue para todos os dias do mês									

Fonte: Dados do quadro enviado pelo autor.

β-lactamase: a cada dia de uso; caso seja a cefinase, somente com a mudança de lote. Antissoros: também devem ser testados com controles positivos e negativos a cada novo lote e entrega, posteriormente devem ser retestados a cada seis meses.

- **Testes rápidos de detecção de antígenos**: inicialmente, devem ser feitos estudos de validação do controle interno frente ao controle externo por 20 dias consecutivos. Para testes que possuem controle interno, controle externo positivo e negativo devem ser testados a cada novo número de lote ou nova entrega. O controle externo deve ser executado de acordo com o fabricante ou a cada 30 dias (considerar o mais frequente).
  Para testes que não possuem controle interno, um controle positivo e outro negativo devem ser testados a cada dia de uso.
- **Instrumentos**: todos os controles devem seguir o recomendado pelo fabricante, sendo que para cada um deles deve existir um *check list* diário de verificação de funcionamento e limpeza.
  Os instrumentos utilizados no laboratório devem também ter uma escala de manutenção, sendo que as anotações dos parâmetros avaliados devem ser mantidas.
  Pipetas, dispensadores automáticos e outros equipamentos utilizados para dispensar materiais de forma quantitativa devem ser avaliados para teste de acurácia e reprodutibilidade em intervalos preestabelecidos.
  Termômetros não certificados devem ser testados anualmente frente a um termômetro padrão.
  O Registro de Temperatura de Equipamentos deve ser feito diariamente para todos os equipamentos em que são processadas amostras de pacientes e/ou contêm reagentes. Alguns itens como banho-maria e termobloco podem ser monitorados somente nos dias de uso.
  O Fluxo Laminar deve ser avaliado anualmente para certificação de que os filtros estejam funcionando.
  Aspectos relacionados ao controle de qualidade dos métodos automatizados para identificação serão abordados ao término do capítulo, juntamente com o controle dos testes de sensibilidade.
  Caso o laboratório utilize mais de um instrumento para liberar o mesmo resultado, estes equipamentos devem ser comparados pelo menos duas vezes ao ano. Contudo, essa recomendação não é aplicável quando são utilizadas diferentes células monitoradas pelo mesmo sistema, como é o caso das hemoculturas.

CONTROLE DE QUALIDADE DOS ANTIMICROBIANOS

O controle de qualidade (CQ) tem como finalidade monitorar a precisão (reprodutibilidade) e acurácia dos procedimentos técnicos empregados na realização de um teste de sensibilidade, aferindo a qualidade dos reagentes e o desempenho dos colaboradores que realizam os testes e fazem a leitura dos resultados. O principal elemento para a realização do controle de qualidade é o uso de cepas de referência de coleções como ATCC – *American Type Culture Collection*. As cepas ATCCs destinam-se à verificação dos resultados obtidos, pois suas características fenotípicas são conhecidas, ou seja, sua identificação e seu perfil de suscetibilidade já foram determinados.

MANUTENÇÃO E CUIDADOS COM AS CEPAS DE REFERÊNCIA

O número de passagens deve ser minimizado para reduzir a possibilidade de variações fenotípicas, mutações genéticas e prováveis contaminações. A recomendação é que a cepa de referência tenha, no máximo, cinco passagens a partir da cepa de referência original, por esta razão essas cepas devem ser acompanhadas de um certificado que indique qual é a sua geração.

A passagem é definida como subcultura, envolvendo o crescimento de microrganismos viáveis em meio fresco. O descongelamento ou a reidratação da cultura de cepas ATCC não é considerada uma passagem.

No caso de armazenamento prolongado, as cepas de referência devem ser mantidas à temperatura de -20 °C, preferencialmente a -60 °C ou em nitrogênio líquido. Essas culturas podem ser guardadas em criotubos com selo de proteção interna contendo leite em pó desnatado a 20% diluído em água destilada e autoclavado a 121 °C por 20 minutos e/ou caldo de soja tríptico com 10% a 15% de glicerol, autoclavado a 121 °C por 20 minutos e/ou sangue de coelho desfibrinado.

MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO (QUALITATIVO)

Para controlar a reprodutibilidade e acurácia dessa metodologia é recomendada a utilização das seguintes cepas de referência para os isolados fastidiosos e não fastidiosos, cujas condições de armazenamento estão de acordo com o Quadro 43.2.

- *Escherichia coli* ATCC® 25922 (Cepa não produtora de β-lactamase)
- *Escherichia coli* ATCC® 35218 (É recomendado apenas como cepa controle para combinações com inibidores das β-lactamases, como aqueles com ácido clavulânico, sulbactam ou tazobactam – cepa produtora de β-lactamase)
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 (Cepa não produtora de β-lactamase)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 (Cepa sensível aos agentes anti-pseudomonas)
- *Haemophilus influenzae* ATCC® 49247 (Controle do meio de HTM e os discos utilizados para o *Haemophilus* spp.)
- *Haemophilus influenzae* ATCC® 49766 (Controle de algumas cefalosporinas)
- *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49226
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619

Quadro 43.2 Condições de incubação e meios utilizados para teste de controle de qualidade

Microrganismo	Meio	Inóculo	Incubação
Haemophilus influenzae	HTM	Suspensão bacteriana direto da colônia	5% de CO_2; 20-24h; 35 °C
Neisseria gonorrhoeae	Meio GC com 1% de suplemento	Suspensão bacteriana direto da colônia	5% de CO_2; 20-24h; 35 °C
Streptococcus pneumoniae	MHA suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado	Suspensão bacteriana direto da colônia	5% de CO_2; 20-24h; 35 °C
Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*	MHA	Suspensão bacteriana direto da colônia	Ar ambiente; 20-24h; 35 °C

HTM, *Haemophilus* Test Medium; MHA, Mueller Hinton Agar.

Observações: *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619 é a cepa designada para o controle de qualidade por disco-difusão para todos os *Streptococcus* sp.

Fonte: Dados do quadro enviado pelo autor.

Cepas de referência suplementares:

- *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603 (Cepa produtora de β-lactamase de espectro ampliado)
- *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-977 (Cepa produtora da resistência induzível mediada pelo *ermA*, portanto D-teste positivo)
- *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-976 (Apresenta o gene *msrA* que medeia o mecanismo de efluxo dos macrolídeos, portanto D- teste negativo)

Pode-se utilizar tanto o *Haemophilus influenzae* ATCC® 49247 quanto o 49766 para o controle de qualidade de rotina.

As cepas de referência suplementares não são obrigatórias, servem para detectar alguns mecanismos de resistência.

Os limites aceitáveis para os halos encontrados para as cepas de referência e os diversos antimicrobianos estão descritos no documento do CLSI M100 ou norma substituta.

FREQUÊNCIA DO CONTROLE DE QUALIDADE POR DISCO-DIFUSÃO

As recomendações nacionais e internacionais preconizam testes semanais. Inicialmente, porém, é necessária uma validação mais apurada, levando em consideração todos os aspectos que podem interferir nesse procedimento e, por essa razão, os testes, a princípio, são realizados diariamente.

Segundo o documento do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), M100-S24 (documento revisado anualmente), para alterar de diário para semanal é indispensável seguir o fluxograma abaixo (Figura 43.1).

De acordo com esse novo fluxograma estabelecido pelo CLSI (M100-S23), os testes podem ser realizados por cinco dias consecutivos em triplicata, ou seja, três testes diferentes com inóculos individuais no mesmo dia durante cinco dias consecutivos, totalizando, com isso, quinze validações. É importante lembrar sempre de documentar esses resultados.

Após a realização desses quinze resultados, pode-se mudar a frequência da validação de diária para semanal somente se uma das quinze leituras de halos para cada combinação de agente/antimicrobiano apresentar um resultado fora do limite aceitável, neste caso essa alteração é permitida, ou seja, a frequência de validação pode ser alterada de diária para semanal.

Caso haja de dois a três resultados fora dos limites aceitáveis preconizados pelo CLSI dentre as quinze leituras realizadas nessa validação, o teste não é validado, por isso é obrigatória a realização de mais três experimentos diários, com inóculos individuais por mais cinco dias consecutivos. Ao término desta repetição, a mudança somente é permitida se, no máximo, dois a três resultados dentre as trinta leituras estiverem fora do limite de aceitabilidade preconizado pelo CLSI. Contudo, se houver um número de resultados fora do limite maior ou igual a quatro, essa alteração não será possível. Dessa maneira, é necessário tomar algumas medidas de correção para iniciar novamente esse programa de validação.

MEDIDAS DE AÇÕES CORRETIVAS TOMADAS QUANDO O CONTROLE DE QUALIDADE APRESENTA RESULTADOS FORA DOS LIMITES ESPERADOS DEVIDO A ERRO EVIDENTE E NÃO EVIDENTE

Erro evidente

Nesses casos, quando a causa do erro pode ser identificada, documente o fato e reteste a cepa no dia em que o erro for observado. Se o resultado repetido estiver dentro dos limites de aceitabilidade, não são necessárias outras ações corretivas. Contudo, se o problema for com a cepa de referência,

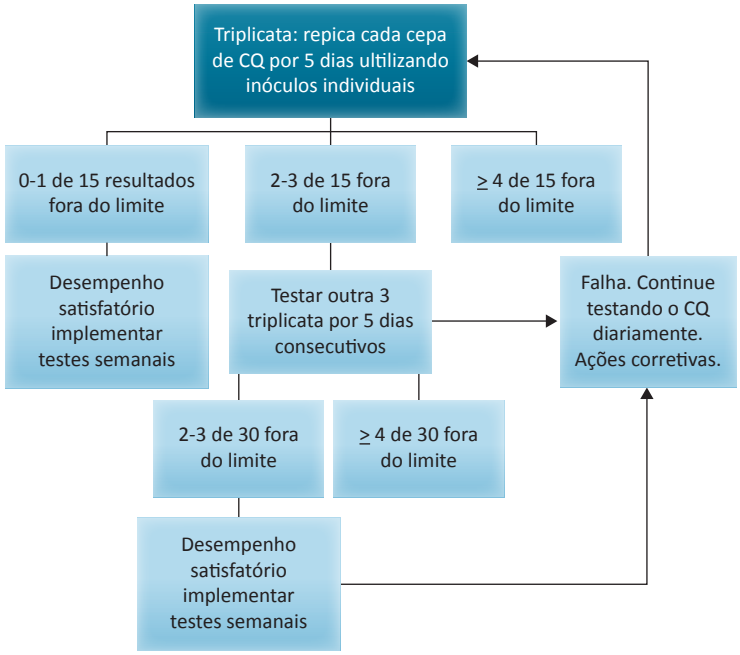


Figura 43.1 Esquema para alterar o controle de qualidade de diário para semanal (triplicata por cinco dias consecutivos).
Fonte: Enviada pelo autor.

obtenha uma nova cepa de trabalho ou uma nova subcultura da cepa de trabalho e reteste o mais rápido possível.

Motivos que podem causar um erro evidente: usar uma cepa de referência errada; contaminação da cepa ou incubação em temperatura inadequada, disco de antimicrobiano errado, ajuste de suspensão bacteriana errada ou uma leitura, interpretação ou transcrição errada dos resultados.

Erro não evidente

Quando os motivos dos erros não são identificados, são tomadas as medidas de ações corretivas. Assim que possível, utilize uma nova cultura de trabalho (cepas de referência) ou uma subcultura da cepa de trabalho por mais cinco dias; se as cinco mensurações estiverem dentro do esperado, continuar com o controle semanal, caso contrário, tomar as ações adicionais de correção.

Ações adicionais de correção: obtenha uma nova cepa de referência (congelador ou fonte confiável) e um novo lote de materiais (inclusive um novo padrão de turbidímetro), se possível de diferentes fornecedores. Caso o problema seja do fornecedor, contate-o e mostre os resultados. Sempre é útil trocar materiais e cepas de controle com outros laboratórios que utilizam a mesma metodologia para solucionar a origem desses problemas indeterminados; enquanto a causa não for determinada, é necessário o uso de uma metodologia alternativa.

Se o problema for identificado e corrigido, documente os resultados por mais cinco dias consecutivos antes de retornar o controle semanal. Caso o controle de qualidade seja realizado juntamente com os testes dos pacientes, os resultados fora dos limites de aceitabilidade do controle devem ser segregados, assim como os testes do paciente até a causa do erro ser corrigida.

Observação: os controles de qualidade podem ser alterados de diários para semanais e também devem ser realizados a cada mudança de lote ou remessa.

No Quadro 43.3 são apresentados os principais problemas observados quando o controle de disco-difusão possui resultados fora do limite de aceitabilidade e um guia para solucionar esses problemas.

MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO OU ÁGAR (QUANTITATIVO)

Para o controle de qualidade recomenda-se o CLSI M7-A, M100-S24 vigentes ou norma substituta. As cepas de referência utilizadas estão listadas a seguir:

Staphylococcus aureus ATCC® 29231; *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212; *Escherichia coli* ATCC® 25922; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853; *Escherichia coli* ATCC® 35218; *Haemophilus influenzae* ATCC® 49247; *Haemophilus influenzae* ATCC® 49766; *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619 e *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49226.

Cepas de referência suplementares:

Klebsiella pneumoniae ATCC® 700603; *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-977; *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-976.

Quadro 43.3 Disco-difusão – guia para solucionar os problemas.

Antimicrobiano	Cepa referência	Observação	Causa do problema	Comentário/ação
Aminoglicosídeo	Qualquer	Halo muito pequeno	pH do meio muito baixo	Acerte o pH = 7,2–7,4, evite incubar em CO_2
Aminoglicosídeo	Qualquer	Halo muito grande	pH do meio bem alto	Acerte o pH = 7,2–7,4
Aminoglicosídeo	*P. aeruginosa* ATCC® 27853	Halo muito pequeno	Conteúdo de Ca^{++} e/ou Mg^{++} muito alto	Use outro lote do meio.
Aminoglicosídeo	*P. aeruginosa* ATCC® 27853	Halo muito grande	Conteúdo de Ca^{++} e/ou Mg^{++} muito baixo	Use outro lote do meio.
Amoxicilina-Clavulanato	*E. coli* ATCC® 35218	Halo muito pequeno	Clavulanato é termolábil. Disco perdeu a potência	Use outro lote do disco. Verifique as condições de armazenamento e a integridade da embalagem.
β-lactâmicos	Qualquer	Halo inicialmente dentro do limite aceitável, mas, com o passar do tempo, fora.	Disco perdeu a potência	Use um novo lote. Verifique as condições de armazenamento e a integridade da embalagem. Imipenem, Clavulanato e Cefaclor são termolábeis.
Aztreonam Cefotaxima Cefpodoxima Ceftazidima Ceftriaxona	*K. pneumoniae* ATCC® 700603	Halo bem grande	Perda espontânea do plasmídeo que codifica o gene de β-lactamase	Estocar estas cepas preferencialmente em ≤ –60 °C ou nitrogênio líquido.
Cefotaxima+ Clavulanato Ceftazidima+ Clavulanato	*K. pneumoniae* ATCC® 700603	Teste confirmatório de ESBL negativo	Perda espontânea do plasmídeo que codifica o gene de β-lactamase	Estocar estas cepas preferencialmente em ≤ –60 °C ou nitrogênio líquido.
Penicilinas	Qualquer	Halo muito grande	pH do meio muito baixo	Acerte o pH = 7,2–7,4, evite incubar em CO_2
Penicilinas	Qualquer	Halo muito pequeno	pH do meio muito alto	Acerte o pH = 7,2–7,4
Clindamicina	*S. aureus* ATCC® 25922	Halo muito pequeno	pH do meio muito baixo	Acerte o pH = 7,2–7,4, evite incubar em CO_2
Clindamicina	*S. aureus* ATCC® 25922	Halo muito grande	pH do meio muito alto	Acerte o pH = 7,2–7,4
Macrolídeos	*S. aureus* ATCC® 25922	Halo muito pequeno	pH do meio muito baixo	Acerte o pH = 7,2–7,4, evite incubar em CO_2
Macrolídeos	*S. aureus* ATCC® 25922	Halo muito grande	pH do meio muito alto	Acerte o pH = 7,2–7,4
Quinolonas	Qualquer	Halo muito pequeno	pH do meio muito baixo	Acerte o pH = 7,2–7,4, evite incubar em CO_2

(*Continua*)

Quadro 43.3 Disco-difusão – guia para solucionar os problemas. (*Continuação*)

Antimicrobiano	Cepa referência	Observação	Causa do problema	Comentário/ação
Quinolonas	Qualquer	Halo muito grande	pH do meio muito alto	Acerte o pH = 7,2–7,4
Sulfonamidas Trimetoprima Trimetoprim-sulfametoxazol	*E. faecalis* ATCC® 29212	Halo ≤ 20 mm	Conteúdo de timidina muito alto	Use outro lote do meio.
Tetraciclina	Qualquer	Halo muito grande	pH do meio muito baixo	Acerte o pH = 7,2–7,4, evite incubar em CO_2
Tetraciclina	Qualquer	Halo muito pequeno	pH do meio muito baixo	Acerte o pH = 7,2–7,4
Tetraciclina	Qualquer	Halo muito pequeno	Conteúdo de Ca^{++} e/ou Mg^{++} muito alto	Use outro lote do meio.
Tetraciclina	Qualquer	Halo muito grande	Conteúdo de Ca^{++} e/ou Mg^{++} muito baixo	Use outro lote do meio.
Vários	Qualquer	Vários halos muito grandes	Inóculo muito leve Erro na preparação do inóculo Meio muito fino MHA nutricionalmente inaceitável (verificar as condições do MHA)	Repetir utilizando escala de McFarland 0,5 do turbidímetro ou escala. Verificar a data de validade da escala e as condições de armazenamento se usar sulfato de bário ou padrões de látex. Usar ágar com profundidade de 4 mm.
Vários	Qualquer	Vários halos muito pequenos	Inóculo muito denso Erro na preparação do inóculo Meio muito grosso MHA nutricionalmente inaceitável (verificar MHA)	Repetir utilizando escala de McFarland 0,5 do turbidímetro ou escala. Verificar a data de validade da escala e as condições de armazenamento se usar sulfato de bário ou padrões de látex. Usar ágar com profundidade de 4 mm.
Vários	Qualquer	Um ou mais halos muito pequenos ou muito grandes	Erro na medição Erro na transcrição Defeito randomizado do disco Disco preso fracamente no ágar	Verificar a leitura e a transcrição dos resultados errados. Retestar. Caso os resultados estiverem fora do limite e nenhum erro for detectado, iniciar as ações corretivas.

(*Continua*)

Quadro 43.3 Disco-difusão – guia para solucionar os problemas. (*Continuação*)

Antimicrobiano	Cepa referência	Observação	Causa do problema	Comentário/ação
Vários	*S. pneumoniae* ATCC® 49619	Halos muito grandes. Camada de crescimento escasso	Placa de inóculo muito velha e contém muitas bactérias não viáveis. Placa do inóculo deve ter de 18–20h.	Replique novamente a cepa de referência e repita o teste ou replique nova cepa do estoque.
Vários	Qualquer	Uma cepa de referência fora do limite, mas outra cepa de CQ dentro do limite para o mesmo antimicrobiano	Uma das cepas de referência pode ser o melhor indicador para o problema	Retestar a cepa e confirmar reprodutibilidade e aceitabilidade dos resultados. Avalie com uma cepa alternativa com CIMs conhecidos. Iniciar as ações corretivas com o problema.
Vários	Qualquer	Duas cepas de referência estão com o controle fora do limite para o mesmo antimicrobiano	Indica um problema com o disco	Use um novo lote de disco e verifique as condições de armazenamento e integridade da embalagem.

Fonte: Adaptado e referendada do documento do CLSI, M100-S24.

As condições de incubação, o meio e o inóculo das diversas cepas de referência estão descritas no Quadro 43.4.

Os limites aceitáveis para as CIMs encontrados para as cepas de referência e os diversos antimicrobianos estão descritos no documento do CLSI M100 ou norma substituta.

FREQUÊNCIA DO CONTROLE DE QUALIDADE PELO MÉTODO QUANTITATIVO

Como apresentado no disco-difusão, a metodologia quantitativa também possui recomendações nacionais e in-

Quadro 43.4 Condições usadas para realizar o controle de qualidade das cepas de referências.

Microrganismo	Meio	Inóculo	Incubação
Haemophilus influenzae	HTM caldo	Suspensão bacteriana direto da colônia	Ar ambiente; 20–24h; 35 °C.
Neisseria gonorrhoeae	Meio GC ágar com 1% de suplemento	Suspensão bacteriana direto da colônia	5% de CO_2; 20–24h; 35 °C.
Streptococcus pneumoniae	CAMHB caldo suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado	Suspensão bacteriana direto da colônia	5% de CO_2; 20–24h; 36 ± 1 °C (não exceder 37 °C).
Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*	MH caldo	Suspensão bacteriana direto da colônia	Ar ambiente; 20–24h; 35 °C.

HTM, *Haemophilus* Test Medium; CAMHB, caldo Mueller Hinton cálcio ajustado; MH, Mueller Hinton

Observações: Pode utilizar tanto o *Haemophilus influenzae* ATCC® 49247 quanto o 49766 para o controle de qualidade de rotina.

O controle de qualidade da *Neisseria Gonorrhoeae* ATCC® 49226 é realizado somente pelo método de ágar diluição.

Fonte: Dados do quadro enviado pelo autor.

ternacionais, as quais preconizam que testes sejam feitos semanalmente. Inicialmente, porém, é necessária a realização de testes diários, conforme a Figura 43.1.

Possíveis falhas no controle de qualidade dos métodos quantitativos podem estar relacionadas a diversos fatores como: má qualidade do meio de cultura, concentração de cátions ou pH fora da faixa recomendada, baixa concentração do antimicrobiano, solução de estoque de antibiótico com concentração fora da preconizada, falhas no procedimento técnico, inóculo com concentração de microrganismos fora da preconizada, tempo e temperatura de incubação não recomendadas, assim como outras ações corretivas já sugeridas na metodologia de disco-difusão.

Como apresentado no disco-difusão, os métodos que determinam a CIM também possuem um guia dos problemas mais encontrados e estão apresentados no Quadro 43.5.

Quadro 43.5 Guia para solucionar os problemas do CQ para os métodos que determinar a CIM.

Antimicrobiano	Cepa referência	Observação	Causa do problema	Comentário/ação
Aminoglicosídeo	Qualquer	CIM muito alta	pH do meio muito baixo	Acerte o pH = 7,2–7,4, evite incubar em CO_2
Aminoglicosídeo	Qualquer	CIM muito baixa	pH do meio bem alto	Acerte o pH = 7,2–7,4
Aminoglicosídeo	*P. aeruginosa* ATCC® 27853	CIM muito alta	Conteúdo de Ca^{++} e/ou Mg^{++} muito alto	Acerte a concentração de Ca^{+2} 20–25 ng/mL, Mg^{+2} 10–12,5 mg/mL
Aminoglicosídeo	*P. aeruginosa* ATCC® 27853	CIM muito baixa	Conteúdo de Ca^{++} e/ou Mg^{++} muito baixo	Acerte a concentração de Ca^{+2} 20–25 ng/mL, Mg^{+2} 10–12,5 mg/mL
Amoxicilina-Clavulanato	*E. coli* ATCC® 35218	CIM muito alta	Clavulanato é termolábil. Disco perdeu a potência	Use outro lote. Verifique as condições de armazenamento e a integridade da embalagem.
β-lactâmicos	Qualquer	CIM inicialmente dentro do limite aceitável, mas, com o passar do tempo, fora.	Degradação do agente antimicrobiano	Use um novo lote. Verifique as condições de armazenamento e a integridade da embalagem. Imipenem, Clavulanato e Cefaclor são termolábeis.
Aztreonam Cefotaxima Cefpodoxima Ceftazidima Ceftriaxona	*K. pneumoniae* ATCC® 700603	CIM bem baixa	Perda espontânea do plasmídeo que codifica o gene de β-lactamase	Estocar estas cepas preferencialmente em ≤ –60 °C ou nitrogênio líquido.
Cefotaxima+ Clavulanato Ceftazidima+ Clavulanato	*K. pneumoniae* ATCC® 700603	Teste confirmatório de ESBL negativo	Perda espontânea do plasmídeo que codifica o gene de β-lactamase	Estocar estas cepas preferencialmente em ≤ –60 °C ou nitrogênio líquido.
Carbapenens	*P. aeruginosa* ATCC® 27853	CIM muito alta	Concentração muito alta de Zn^{+2} no meio	Use um novo lote.
Carbapenens	*P. aeruginosa* ATCC® 27853	CIM muito alta	Degradação do agente antimicrobiano	Use um novo lote. Verifique as condições de armazenamento e integridade da embalagem. Resultados repetidos do Imipenem de 4 μg/mL para *P. aeruginosa* ATCC® 27853 pode indicar deterioração da droga.

(*Continua*)

Quadro 43.5 Guia para solucionar os problemas do CQ para os métodos que determinar a CIM. (*Continuação*)

Antimicrobiano	Cepa referência	Observação	Causa do problema	Comentário/ação
Penicilinas	*S. aureus* ATCC®29213	CIM muito alta	Cepa produtora de β-lactamase, vários repiques podem aumentar a CIM	Repita o procedimento com um inóculo cuidadosamente ajustado.
Penicilinas	Qualquer	CIM muito baixa	pH do meio muito baixo	Acerte o pH = 7,2–7,4
Clindamicina	*S. aureus* ATCC®29213 *E.faecalis* ATCC®29212	CIM muito alta	pH do meio muito baixo	Acerte o pH = 7,2–7,4, evite incubar em CO_2
Clindamicina	*S. aureus* ATCC®29213 *E. faecalis* ATCC®29212	CIM muito baixa	pH do meio muito alto	Acerte o pH = 7,2–7,4
Daptomicina	*S. aureus* ATCC®29213 *E. faecalis* ATCC®29212	CIM muito alta CIM muito baixa	Conteúdo baixo de Ca^{+2} Conteúdo alto de Ca^{+2}	Conteúdo aceitável de Ca^{+2} 50 μg/mL em CAMHB. Ajuste a concentração de Ca^{+2} ou mude o lote.
Macrolídeos e Ketolídeos	*S. aureus* ATCC® 29213 *E. faecalis* ATCC® 29212	CIM muito alta	pH do meio muito baixo	Acerte o pH = 7,2–7,4, evite incubar em CO_2
Macrolídeos e Ketolídeos	*S. aureus* ATCC® 29213 *E. faecalis* ATCC® 29212	CIM muito baixa	pH do meio muito alto	Acerte o pH = 7,2–7,4
Quinolonas	Qualquer	CIM muito alta	pH do meio muito baixo	Acerte o pH = 7,2–7,4, evite incubar em CO_2
Quinolonas	Qualquer	CIM muito baixa	pH do meio muito alto	Acerte o pH = 7,2–7,4
Tetraciclina	Qualquer	CIM muito baixa	pH do meio muito baixo	Acerte o pH = 7,2–7,4, evite incubar em CO_2
Tetraciclina	Qualquer	CIM muito alta	pH do meio muito baixo	Acerte o pH = 7,2–7,4
Tetraciclina	Qualquer	CIM muito alta	Conteúdo de Ca^{++} e/ou Mg^{++} muito alto	Acerte a concentração de Ca^{+2} 20–25 ng/mL, Mg^{+2} 10–12,5 mg/mL
Tetraciclina	Qualquer	CIM muito baixa	Conteúdo de Ca^{++} e/ou Mg^{++} muito baixo	Acerte a concentração de Ca^{+2} 20–25 ng/mL, Mg^{+2} 10–12,5 mg/mL
Tigeciclina	Qualquer	CIM muito alta	O caldo CAMHB deve ser bem fresco (novo)	O caldo fresco de CAMHB não pode ter mais que 12h de preparação.

(*Continua*)

Quadro 43.5 Guia para solucionar os problemas do CQ para os métodos que determinar a CIM. (*Continuação*)

Antimicrobiano	Cepa referência	Observação	Causa do problema	Comentário/ação
Vários	Qualquer	Várias CIM muito baixas	Inóculo muito leve. Erro na preparação do inóculo	Repetir utilizando escala de McFarland 0,5 do turbidímetro ou escala. Verificar a data de validade da escala e as condições de armazenamento se usar sulfato de bário ou padrões de látex. Verifique os passos de preparação do inóculo e os procedimentos de inoculação. Realize a contagem de colônias do controle de crescimento imediatamente após a inoculação e antes da incubação (*E. coli* ATCC® 25922 tem aproximadamente 5×10^5UFC/mL)
Vários	Qualquer	Várias CIMs muito altas	Inóculo muito denso	Repetir utilizando escala de McFarland 0,5 do turbidímetro ou escala. Verificar a data de validade da escala e as condições de armazenamento se usar sulfato de bário ou padrões de látex. Verifique os passos de preparação do inóculo e os procedimentos de inoculação. Realize a contagem de colônias do controle de crescimento imediatamente após a inoculação e antes da incubação (*E. coli* ATCC® 25922 tem aproximadamente 5×10^5 UFC/mL)
Vários	Qualquer	Várias CIMs muito altas e baixas	Possivelmente um erro de leitura e/ou transcrição	Verifique as leituras e use um lote novo.

Fonte: Adaptado e referendado do documento do CLSI, M100-S24.

CONTROLE DE QUALIDADE DE MÉTODOS AUTOMATIZADOS

Existem alguns equipamentos automatizados que realizam a identificação e os testes de suscetibilidade da maioria dos microrganismos isolados em amostras clínicas. Com relação à sensibilidade, as empresas utilizam painéis (cartões) ou placas com número limitado de concentrações preestabelecidas. Essa metodologia oferece uma CIM aproximada, já que existem apenas algumas concentrações para cada antimicrobiano.

Com o passar do tempo, os sistemas de identificação automatizada se tornaram mais complexos, incorporando em seus painéis inúmeras provas bioquímicas; com isso, houve a necessidade de aumentar os números de cepas de referência para verificar a reatividade positiva e negativa de todos

os componentes do sistema de identificação. Devido a essa necessidade, nos Estados Unidos foi criado um órgão regulatório que normatiza todos os sistemas de identificação microbiológico comercial (MIS), denominado CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments). O CLIA regulariza os laboratórios para testarem um controle positivo e negativo com amostras de controle biológico em todos os substratos e reagentes para os diferentes lotes e remessas.

A Sociedade Americana de Microbiologia (ASM), em 2005, depois de considerar essa questão, através da sugestão do Clinical Laboratory Improvement Advisory Committee (CLIAC), realizou uma pesquisa em vários laboratórios de microbiologia para determinar as taxas de falhas desses sistemas de identificação comerciais. As taxas de falhas do controle de qualidade relacionadas a esses sistemas foram extremamente raras, menores que 0,1%.

A ASM apresentou os dados da pesquisa para o CLIAC e recomendou ao CLSI analisar esses dados e elaborar diretrizes relacionadas ao controle de qualidade apropriado ao sistema de identificação comercial (CLSI M50-A). Este documento recomenda um esquema que inclui cepas de referência adequadas que possibilitam detectar no MIS a degradação de reagentes e substratos lábeis.

O sistema automatizado é extremamente ágil na liberação dos resultados; em alguns casos, o resultado é liberado em menos de seis horas. Essa agilidade em microrganismos um pouco mais fastidiosos, de difícil crescimento, pode ocasionar uma falsa sensibilidade ou falsa resistência no teste de sensibilidade.

O equipamento possui uma série de manutenções. Além da preventiva, que consiste em seguir um protocolo determinado pelo fabricante, existe a limpeza mensal do equipamento. Essa limpeza, de preferência, deve ser realizada por um profissional treinado pelo fabricante. Com o equipamento, vem um turbidímetro, que ajusta a escala de turvação para os cartões (painéis) que serão inseridos na máquina. Esse turbidímetro é aferido diariamente com uma escala de McFarland, também fornecida pelo fabricante.

O dispensador da salina usado para diluir os microrganismos precisa ser autoclavado ao menos uma vez por mês ou em cada reposição da salina. O controle de esterilidade é muito importante, também conhecido como controle de pureza do inóculo. Esse controle é realizado com a suspensão bacteriana inserida no equipamento, ou seja, o colaborador seleciona um determinado microrganismo, sem tocar no isolado ao lado e, com o auxílio do turbidímetro, ajusta a escala de turvação para este microrganismo e insere o cartão com a suspensão bacteriana dentro do equipamento. Quando essa suspensão sair do equipamento, uma pequena alíquota dessa solução é semeada em um meio de crescimento, como, por exemplo, um meio cromogênico ou ágar sangue. Com isso, no controle de pureza, irá crescer somente o isolado selecionado e, com certeza, o resultado do antibiograma ou da identificação será confiável. Além disso, consegue-se verificar a pureza da salina, pois, se o mesmo isolado aparecer em todos os controles de pureza, provavelmente, houve uma contaminação dessa salina.

FREQUÊNCIA DO CONTROLE DE QUALIDADE DE CARTÕES DE IDENTIFICAÇÃO PELO MÉTODO AUTOMATIZADO

Para o controle de qualidade dos cartões de identificação, o fabricante do equipamento Vitek 2 da bioMerieux recomenda as cepas de referência apresentadas nos Quadros 43.6 e 43.7. Nesses quadros pode-se observar dois tipos de validação, uma abrangente e uma simplificada. Segundo o CLIA, se o usuário do equipamento tiver realizado um estudo de verificação para o sistema de identificação comercial antes de setembro de 1992 e demostrado que o desempenho dos resultados (comportamento funcional) é comparável com os do fabricante, o controle de qualidade verificado pelo usuário pode ser imediatamente implantado e a documentação da verificação do estudo deve ser avaliada.

Aos usuários que não se qualifiquem para testes de controle de qualidade simplificado é exigido que executem testes de controle de qualidade abrangentes, o que engloba a demonstração de reação positiva e negativa para cada substrato de um produto de identificação. Se o usuário não fizer um estudo de verificação como descrito acima, deverá, ao menos, realizar um controle de qualidade abrangente em três lotes diferentes oriundos de estações climáticas distintas. O controle simplificado é realizado semanalmente, em lotes diferentes e a cada nova remessa, de acordo com o documento do CLSI M50-A.

FREQUÊNCIA DO CONTROLE DE QUALIDADE DOS CARTÕES DE SENSIBILIDADE PELO MÉTODO AUTOMATIZADO

De acordo com o CLSI, a frequência periódica do controle de qualidade dos cartões de sensibilidade é semanal e também a cada novo lote e remessa, utilizando as cepas de referência mencionadas acima. Esse protocolo de controle de qualidade periódico somente poderá ser realizado após uma validação diária de três testes individuais, com inóculos diferentes durante cinco dias consecutivos, totalizando quinze resultados, validação descrita no documento do CLSI M100-S24. Quando houver uma mudança de tipo de cartão também é preciso que seja feita essa validação diária, como, por exemplo, o painel utilizado para sensibilidade de levedura era AST-YS01 e o fabricante mudou para AST-YS07.

Diferente dos métodos quantitativos, os resultados da validação são interpretados pelo próprio equipamento. Como os métodos automatizados apresentam determinadas faixas de concentração inibitória mínima, os limites de aceitabilidade das cepas de referência são definidos pelo fabricante do equipamento. Porém, os critérios para validar e alterar a frequência dos cartões de sensibilidade de diária para semanal são os mesmos apresentados nos métodos quantitativos, fluxograma descrito na Figura 43.1.

Quadro 43.6 Cepas de referência sugeridas pelo fabricante para o controle de qualidade dos cartões de identificação.

Cartão VITEK 2	Controle de qualidade abrangente	Controle de qualidade simplificado
ANC (identificação de anaeróbios)	*Bacteroides ovatus* ATCC® BAA-1296 *Bacteroides vulgatus* ATCC® 8482 *Clostridium perfringens* ATCC® 13124 *Clostridium septicum* ATCC® 12464 *Clostridium sordellii* ATCC® 9714 *Corynebacterium striatum* ATCC® BAA-1293 *Parabacteroides distasonis* ATCC® BAA-1295	*Clostridium septicum* ATCC® 12464 *Bacteroides ovatus* ATCC® BAA-1296
GN (identificação de Gram-negativos)	*Acinetobacter baumannii* ATCC® BAA-747 *Elizabethkingia meningoseptica* ATCC® 13253 *Enterobacter hormaechei* ATCC® 700323 *Klebsiella oxytoca* ATCC® 700324 *Ochrobactrum anthropi* ATCC® BAA-749 *Proteus vulgaris* ATCC® 6380 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9721 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® BAA-1744 *Shigella sonnei* ATCC® 25931 *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC® 17666	*Enterobacter hormaechei* ATCC® 700323 *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC® 17666
GP (identificação de Gram-positivos)	*Enterococcus casseliflavus* ATCC® 700327 *Enterococcus saccharolyticus* ATCC® 43076 *Kocuria kristinae* ATCC® BAA-752 *Listeria monocytogens* ATCC® BAA-751 *Staphylococcus saprophyticus* ATCC® BAA-750 *Staphylococcus sciuri* ATCC® 29061 *Streptococcus equi* spp. *zooepidemicus* ATCC® 43079 *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619 *Streptococcus thermophilus* ATCC® 19258	*Enterococcus casseliflavus* ATCC® 700327 *Staphylococcus saprophyticus* ATCC® BAA-750
NH (identificação de cepas fastidiosas)	*Eikenella corrodens* ATCC® BAA-1152 *Aggregatibacter aphrophilus* ATCC® 33389 *Haemophilus influenzae* ATCC® 9007 *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 19424 *Neisseria lactamica* ATCC® 23970 *Oligella urethralis* ATCC® 17960 *Enterobacter aerogenes* ATCC® 13048 *Paenibacillus polymyxa* ATCC® 7070 *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228	*Eikenella corrodens* ATCC® BAA-1152
YST (identificação de leveduras)	*Candida albicans* ATCC® 14053 *Candida glabrata* ATCC® MYA-2950 *Candida lusitaniae* ATCC® 34449 *Candida utilis* ATCC® 9950 *Kloeckera japonica* ATCC® 58370 *Prototheca wickerhamii* ATCC® 16529 *Sporobolomyces salmonicolor* ATCC® MYA-4550 *Trichosporon mucoides* ATCC® 204094 *Zygosaccharomyces bailii* ATCC® MYA-4549 *Oligella ureolytica* ATCC® 43534 *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228	*Candida albicans* ATCC® 14053

Fonte: Adaptado e referendado pelo fabricante do equipamento.

Quadro 43.7 Cepas de referência sugeridas pelo fabricante para o controle de qualidade dos cartões de sensibilidade.

Cartão VITEK 2	Controle de qualidade – Cartões AST
AST-N104 AST-N105 AST-N238 AST-N239 (sensibilidade para Gram-negativos)	*Escherichia coli* ATCC® 25922 *Escherichia coli* ATCC® 35218 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae* ATCC® 700603
AST-P585 e P-612 (sensibilidade para Gram-positivos)	*Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 *Enterococcus faecalis* ATCC® 51299 *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-1026 *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-976 *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-977
AST-YS01 e AST-YS07 (sensibilidade para leveduras)	*Candida parapsilosis* ATCC® 22019 *Candida krusei* ATCC® 6258

Fonte: Adaptado e referendado pelo fabricante do equipamento.

Vale ressaltar os principais problemas encontrados nos métodos automatizados que podem ocasionar controle de qualidade fora dos limites de aceitabilidade. Encontra-se em anexo um guia para solucionar esses problemas; nesse quadro estão presentes critérios que causam falhas no controle de qualidade de painéis de identificação e sensibilidade (Quadro 43.8).

Quadro 43.8 Guia para solucionar as falhas do controle de qualidade dos métodos automatizados.

Parâmetro processual	Subparâmetro	Critérios para verificação (quando aplicável)
Cultura	Manutenção	Quantas subculturas foram realizadas antes de usar para o teste? Se vier de um estoque congelado ou liofilizado, devem ser feitas pelo menos duas subculturas. Consulte as recomendações do fabricante para instruções específicas.
		Quanto tempo as subculturas estão estocadas? Consulte as recomendações do fabricante para verificar se as subculturas são armazenadas em temperatura ambiente ou refrigeradas.
	Meio de isolamento	Foi utilizado o tipo de meio correto? Embora muitos meios de cultura possam ser permitidos para os testes normais, recomendações do controle de qualidade podem ser mais restritivas. Verifique as recomendações do fabricante.
		A cultura ou meio de isolamento estão contaminados?
		O meio de isolamento está vencido?
		O meio de cultura foi comprado de um representante comercial ou é produzido *in house*. Se for produzido *in house*, as instruções foram seguidas corretamente para a formulação, pH e esterilidade?
	Temperatura	As temperaturas de armazenamento e incubação estão na faixa?
	Tempo	O tempo de armazenamento e incubação está na faixa?
	Atmosfera	As culturas foram incubadas e estocadas em atmosfera correta (por exemplo: aerobiose, anaerobiose, 3% a 5% de CO_2).
	Colônias	Elas estão isoladas e puras?

(*Continua*)

Quadro 43.8 Guia para solucionar as falhas do controle de qualidade dos métodos automatizados. (*Continuação*)

Parâmetro processual	Subparâmetro	Critérios para verificação (quando aplicável)
Inóculo	Diluente	Foi verificada a esterilidade?
		Foi usado o diluente correto? (por exemplo, água ou salina)
		A concentração da salina está correta?
		Caso seja salina fisiológica, tenha certeza de que não há a adição de glicose.
		O pH está correto? Por exemplo, um vidro novo e sujo de boro silicato pode aumentar o pH para fora dos limites.
	Turbidez – Método automatizado	A calibração do instrumento foi verificada com um padrão conhecido?
		A calibração padrão está no prazo de validade?
		As instruções do fabricante foram seguidas para ajustar o tipo de tubo adequado para o instrumento, isto quando aplicável?
		Caso seja recomendado, a linearidade pode ser ajustada para transmissão de 0% e 100%?
	Suspensão	A suspensão foi bem homogeneizada sem aglomerados? Deve-se tomar cuidados para alcançar uma suspensão uniforme em organismos aglomerados, filamentosos e mucoides. Isso pode ser feito esmagando o inóculo contra a superfície interna do tubo antes de entrar em contato com o líquido. Misturando gradativamente o líquido com o inóculo, irá formar uma suspensão uniforme. Se os aglomerados não puderem ser evitados, deixe que se separem e retire a porção uniforme da suspensão e coloque em um novo tubo.
	Idade da suspensão	A idade da suspensão está na faixa? Manter a suspensão muito velha pode diminuir a viabilidade ou degradar as enzimas pré-formadas.
	Tempo de medição – para medição automática de turvação	A suspensão pode ser medida diretamente após a sua preparação, enquanto estiver bem misturada. Se a medição foi atrasada, a suspensão foi misturada novamente? Quando se demora para medir a turvação, pode haver precipitação das células e, com isso, ocasionar falsas leituras (altas), devido a várias células interferindo na leitura óptica.
	Método automatizado	O MIS está intacto? Foi danificado de alguma forma antes do uso?
		O volume dispensado foi correto? Por exemplo, se for preenchimento a vácuo, verifique o tubo do inóculo, que deve estar quase vazio.
Incubação MIS	Temperatura	O MIS foi incubado em temperatura correta?
	Tempo	O tempo de incubação foi adequado?
	Tempo entre preparo do inóculo e incubação	O produto foi incubado logo após a sua preparação? O prazo entre a preparação e a incubação afetou o resultado do QC? O guia do fabricante pode ser usado para definir o tempo que pode ser esperado após a preparação do inóculo.
Interpretação automática MIS	Autoteste	As manutenções do equipamento são realizadas como recomendado?
		É verificada a calibração óptica?

(*Continua*)

Quadro 43.8 Guia para solucionar as falhas do controle de qualidade dos métodos automatizados. (*Continuação*)

Parâmetro processual	Subparâmetro	Critérios para verificação (quando aplicável)
Interpretação automática MIS	Teste de adição de reagente	Foi usado no teste reagente recomendado pelo fabricante?
		O reagente está vencido?
		Os reagentes foram estocados em condições adequadas?
		O reagente está descolorido ou apresenta partículas de material? Se sim, o fabricante advertiu o seu uso?
		A manutenção do equipamento é feita como recomendada?
		Foi verificada a calibração óptica?
		Todas as linhas de fornecimento estão limpas e desobstruídas de precipitados?
Cepas de referência	Manutenção da cultura	As subculturas repetidas podem causar expressões fenotípicas diferentes. Reteste o controle de qualidade problemático com uma cepa de referência do estoque e siga as instruções do fabricante para manutenção das culturas antes de repetir o teste.
	Geral	Contacte o fabricante para informações adicionais.

Fonte: Dados do quadro enviado pelo autor.

Finalizando, um aspecto que chama a atenção na rotina laboratorial é que, na realização de tantos controles, eventualmente se perde a noção do todo e dos aspectos que consistentemente podem estar alterando o desempenho da rotina. Para tanto, sugere-se que o laboratório reúna os seus principais controles com respectivos desempenhos para mais prontamente agir com melhorias. No Quadro 43.9, apresenta-se um modelo para isso.

Quadro 43.9 Modelo de avaliação global mensal do controle de qualidade.

Mês				
Nº	Teste	Frequência	Número de execuções	% erros corretos
1º	Inspeção visual de meio de cultura	Lote		
2º	Validação de meios de cultura com ATCC	Lote		
3º	Cartão de identificação do VITEK	Lote		
4º	Cartão de suscetibilidade do VITEK	Semanal		
5º	Cartão de suscetibilidade do VITEK	Lote		
6º	Turbidez para preparação do inóculo	Diário		
7º	Gram	Diário		
8º	Ziehl Neelsen	Diário		
9º	Testes rápidos	Lote		
10º	Testes de aglutinação	Lote		
11º	Fitas de E *test*	Mensal		
12º	Fitas de E *test*	Lote		
13º	Disco-difusão e ágar *screening*	Semanal		
Análise dos problemas:				

Fonte: Dados do quadro enviado pelo autor.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Ninth Edition.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012;32(1).
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Quality Control for Commercial Microbial Identification Systems. Approved Guideline. CLSI document M50-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008;28(23).
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014;34(1).
6. CLSI document M07-A09. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012;32(2).
7. College of American Pathologists- Microbiology Checklist-2013. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.cap.org/apps/docs/laboratory_accreditation/checklists/new/microbiology_checklist.pdf
8. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al. Manual of clinical microbiology. 9.ed. ASM, 2007.
9. Normas para Acreditação do Programa Acreditação Laboratórios Clínicos. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. (PALC). 2013
10. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, et al. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2010.
11. Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde. Controle interno da qualidade para testes de sensibilidade a antimicrobiano, 2006.

PARTE

8

Parasitologia

Lenilza Mattos Lima

44

capítulo

Protozoários

Complexo *Entamoeba Histolytica*/*Entamoeba Dispar*

José Mauro Peralta ▪ Regina Helena Saramago Peralta

INTRODUÇÃO

O gênero *Entamoeba* é um dos gêneros de protozoários de importância médica que parasitam o homem. Seis espécies deste gênero podem ser encontradas em fezes humanas: *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. polecki*, *E. coli* e *E. hartmanni*. No entanto, apenas a *E. histolytica* é considerada patogênica e agente etiológico da amebíase, capaz de causar lesões intestinais e extraintestinais (WHO, 1997; Fotedar e col., 2007b). A *E. dispar*, apesar de não ser capaz de causar lesões em humanos, apresenta cepas que demonstram um perfil potencialmente patogênico. Estas cepas são capazes de causar lesões em fígado e intestino que, algumas vezes, são indistinguíveis das lesões produzidas pela *E. histolytica* (Costa e col., 2006; Guzmán-Silva e col. 2013; Oliveira e col., 2015).

A classificação taxonômica da *E. histolytica* é reino Protista, filo Sarcomastigofora, subfilo Sarcodina, superclasse Rhizopoda, classe Lobosea, subclasse Gymnamoebia, ordem Amoebida, subordem Tubulina e família Entamoebidae (Tanyuksel & Petri, 2003).

A *E. histolytica* é um dos principais agentes responsáveis por infecções diarreicas e outras manifestações clínicas mais graves, com estimativas de 50 milhões de casos de amebíase em habitantes de áreas endêmicas, causando de 40.000 a 110.000 mortes anualmente. Essas estimativas indicam que a amebíase é a segunda maior causa de morte por doenças parasitárias (Ali e col., 2008). No entanto, os dados epidemiológicos relacionados à infecção por *E. histolytica* estão sendo reavaliados, visto que a maior parte dessas informações foi obtida por meio da microscopia óptica e antes da separação formal da *E. histolytica* em duas espécies morfologicamente idênticas (Beck e col., 2008; Fotedar e col., 2007a). Essa reclassificação inferiu a necessidade de ferramentas moleculares para a acurada diferenciação das espécies, indicando que muitas infecções associadas a esse parasito podem estar relacionadas à presença de *E. dispar* (WHO, 1997). A prevalência da *E. dispar* é pouco conhecida e se especula que deva ser a responsável pela maior parte das infecções que eram associadas a *E. histolytica*.

No Brasil, a amebíase é uma importante causa de morbidade. A *E. histolytica* é mais prevalente em Manaus, com 6,8% da população infectada, em Fortaleza (14,9% da população carente) e em Belém, com 29,5% dos indivíduos da área metropolitana. Nas demais áreas do país, estudos têm demonstrado uma maior prevalência de *E. dispar*. Em Pernambuco, Belo Horizonte, Salvador e Rio de Janeiro, apenas a *E. dispar* tem sido detectada (Santos e col., 2007; Oliveira e col., 2015).

MORFOLOGIA

A *E. histolytica* e a *E. dispar* são duas espécies morfologicamente idênticas, por isso foi sugerido pela Organização Mundial da Saúde que a presença de estruturas características dessas espécies fossem relatadas como complexo *E. histolytica*/*E. dispar* em resultados de exames parasitológicos de fezes, método realizado por meio da microscopia óptica (WHO, 1997). Atualmente, a *E. moshkovskii* também é considerada por alguns autores como uma espécie morfologicamente idêntica à *E. histolytica*. Essas três espécies existem em duas formas morfológicas: o cisto e o trofozoíto. O cisto apresenta um diâmetro entre 10 e 15 μm, contém um a dois núcleos em seu estado imaturo e quatro em seu estado maduro (Figura 44.1). Na coloração permanente podem ser vistos os corpos cromatoides no citoplasma em forma de bastonetes com as extremidades arredondadas. O trofozoíto, por outro lado, é uma estrutura frágil que apresenta um único núcleo e motilidade através da formação de pseudópodes; esse estágio do parasito tem um tamanho médio que varia de 15 a 20 μm, mas pode alcançar até 60 μm. O citoplasma é diferenciado em ectoplasma hialino e endoplasma finamente granuloso (Figura 44.2 A e B). A membrana nuclear é revestida de grânulos cromáticos distribuídos de forma regular. O núcleo tanto do cisto como do trofozoíto tem cariossoma pequeno e central, ou ligeiramente excêntrico.

Figura 44.1 Cisto do complexo *E. histolytica/E. dispar* corado pelo Lugol (Imagem capturada no Laboratório de Parasitologia do Hospital Universitário Antônio Pedro – UFF).

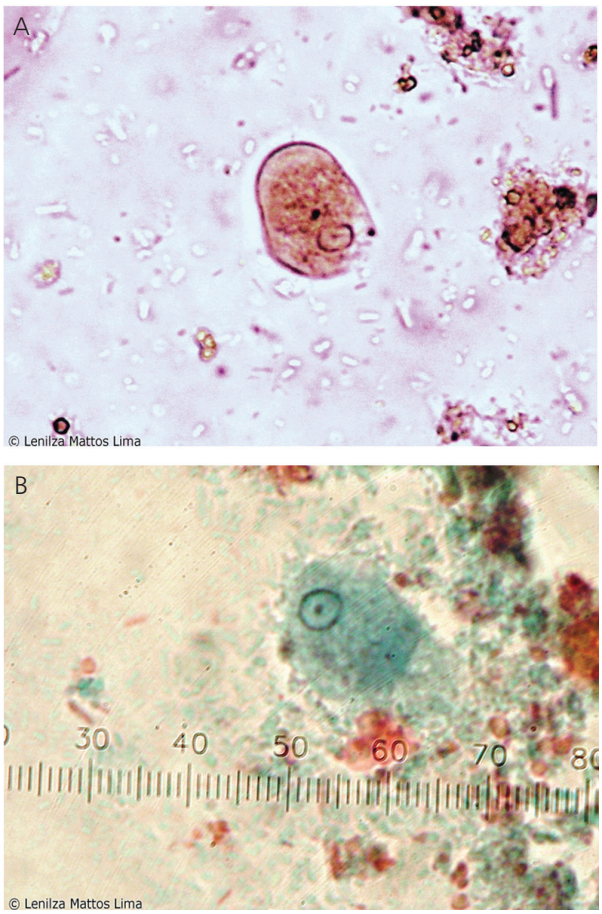


Figura 44.2 Trofozoítos do complexo *E. histolytica/E. dispar*. **(A)** Corado pelo Lugol. Objetiva de 40×. Notar a diferença entre ectoplasma hialino e endoplasma granuloso. **(B)** Corado pelo tricrômico. Objetiva de 100× – escala ocular: fator de multiplicação 1.
Fonte: http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br.

CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

O ciclo biológico de *E. histolytica* se inicia através da ingestão dos cistos maduros tetranucleados, que constituem a forma infectante do parasito. Essa estrutura é transportada pelo trato digestório até alcançar a região terminal do íleo, onde passa por um processo de excisão, originando oito trofozoítos. Os trofozoítos são maiores e mais ativos, se alimentando e podendo multiplicar-se por fissão binária indefinidamente na luz do intestino grosso. Esses parasitos são também capazes de aderir às células epiteliais presentes na mucosa do intestino e invadir o tecido. Em determinado momento da infecção, os trofozoítos passam a se modificar para constituir a forma pré-cística. No processo de encistamento, a célula reduz sua atividade e tamanho, ocorrem alterações no citoplasma e são verificados numerosos depósitos de glicogênio, que vão desaparecendo ao longo do processo. Um envoltório resistente é formado em torno da célula e ocorrem duas divisões do núcleo, originando um cisto maduro tetranucleado, que é excretado do organismo hospedeiro e pode resistir de semanas a meses no meio ambiente.

A transmissão geralmente ocorre através da ingestão de água ou alimentos contaminados, mas a transmissão pessoa a pessoa também tem sido relatada. Outra possibilidade de transmissão é por via zoonótica, principalmente relacionada a animais domésticos devido ao contato próximo com os humanos.

PATOGENIA E ASPECTOS CLÍNICOS

Na luz do intestino grosso, os trofozoítos da *E. histolytica* se locomovem por pseudópodes que puxam o restante da célula e permitem também a fagocitose de nutrientes e hemácias. Esses parasitos são também capazes de aderir às células epiteliais presentes na mucosa do intestino e, a partir disso, invadir o tecido. A invasão do tecido ocorre através das lesões causadas pela interação do tecido com os trofozoítos, que, se forem demasiadamente profundas, permitem que essas células alcancem a corrente sanguínea e sejam carreadas para outros locais, gerando lesões em outros órgãos, principalmente fígado, mas também pulmões e cérebro, constituindo uma amebíase extraintestinal (Haque e col., 2010).

Os mecanismos de patogenia da espécie *E. histolytica* são os responsáveis pela invasão do tecido do hospedeiro, um processo complexo que envolve várias moléculas e abrange vários estágios. Esse conjunto de moléculas inclui a lectina ligante de galactose e a N-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNAc lectina), proteínas formadoras de poro e as cisteína proteinases. A Gal/GalNAc lectina é uma molécula de superfície do parasito que se liga especificamente a resíduos de galactose e N-acetil-galactosamina presentes na membrana das células epiteliais, promovendo aderência e constituindo um importante fator de virulência, visto que essa aderência desencadeia uma cascata de moléculas sinalizadoras para a produção e liberação de outros fatores de patogenicidade. Um modelo proposto para a invasão da mucosa do hospedeiro sugere que o processo começa com o contato e ligação do trofozoíto, mediado pela

Gal/GalNAc lectina, seguida pela morte da célula do hospedeiro, por pelo menos dois mecanismos já identificados: a permeabilização através dos amebaporos e a indução de apoptose. As células apoptóticas são geralmente fagocitadas pelo trofozoíto. As cisteína proteinases secretadas desorganizam a matriz, possibilitando a invasão e facilitando a difusão lateral do parasito dentro da mucosa. No final do processo de invasão, as células do hospedeiro têm um papel importante para permitir esse processo, secretando citocinas, como, por exemplo, a interleucina-8 (IL-8), que atraem neutrófilos e macrófagos. Na corrente sanguínea, o trofozoíto interage com o sistema complemento, e várias moléculas da superfície do parasito são responsáveis por resistir a esse ataque, como os complexos lipofosfopeptideoglicanos, a peroxiredoxina, inúmeras proteases e a Gal/GalNAc lectina (Garcia, 2007). Esses mecanismos são determinados por fatores genéticos da cepa de *E. histolytica*, contribuindo para a virulência da cepa e, consequentemente, sua capacidade de provocar lesão no tecido. No entanto, a ocorrência de doença invasiva não é apenas determinada pela virulência da cepa. Fatores genéticos do hospedeiro também podem contribuir para uma maior ou menor suscetibilidade à lesão provocada pelo parasito.

A *E. dispar* é descrita como não patogênica ou não invasiva por alguns estudos. As duas espécies de amebas têm aproximadamente os mesmos genes que codificam a maioria dos fatores de virulência. Entretanto, a *E. dispar* secreta uma quantidade 10 a 1.000 vezes menor de cisteína proteases do que a *E. histolytica*, e a Gal/GalNAc lectina da *E. dispar* tem uma capacidade reduzida de adesão e de citotoxidade quando testada *in vitro*.

A infecção intestinal pelo complexo *E. histolytica/E. dispar* é assintomática em 90% dos casos, podendo resultar mais tardiamente em colite amebiana ou complicações mais graves, além de a condição de portador assintomático favorecer a transmissão de cistos infectantes do parasito. Os outros 10% da população de indivíduos infectados apresenta amebíase sintomática, com lesões intestinais e, eventualmente, em outros órgãos. Acredita-se que a maioria dos casos assintomáticos se deve à infecção por *E. dispar*, mas casos assintomáticos também são observados em infecção com a *E. histolytica*. A amebíase intestinal é a mais incidente, podendo apresentar quatro formas clínicas geralmente agudas: disenteria, colite fulminante, apendicite amebiana e ameboma do cólon. A disenteria amebiana representa 90% dos casos de amebíase intestinal e se caracteriza por dor abdominal, leucocitose discreta e evacuações frequentes. A febre, geralmente ausente, ocorre em menos de 40% dos casos. As evacuações, em princípio, caracterizam uma diarreia aquosa, mas rapidamente evoluem para disenteria, com eliminação de muco e sangue. Os sintomas mais graves podem se atenuar entre 4 e 5 dias e a doença passar para uma fase crônica ou subaguda. A colite amebiana crônica se caracteriza por crises diarreicas que duram poucos dias e são intercaladas por períodos longos sem sintomas, mas pode evoluir para a forma fulminante, que é um quadro grave com profusa diarreia mucossanguinolenta e atinge principalmente mulheres grávidas, pacientes imunocomprometidos e pacientes que fazem uso de corticosteroides. Outra forma preocupante de amebíase intestinal é a formação de amebomas, que podem causar sintomas obstrutivos, passíveis de serem confundidos com carcinomas. A mortalidade é superior a 40% nestas formas graves da amebíase.

Na amebíase extraintestinal a forma hepática é a mais comum da doença, com lesões no fígado evidentes em um terço dos casos fatais de amebíase. Os abcessos hepáticos amebianos surgem devido à difusão hematogênica dos trofozoítos pela circulação porta. Os sinais clínicos podem surgir com hepatomegalia, febre, calafrios, náuseas, suores, fraqueza, vômitos, perda de peso e dor. A amebíase pleuropulmonar é uma manifestação extraintestinal que ocorre em 2% a 3% dos casos de doença invasiva e frequentemente está associada ao abcesso hepático, como uma lesão secundária. Há também ocorrências mais raras como as lesões cerebrais, que podem ser confundidas com abcessos piogênicos ou serem completamente inespecíficas, tornando o diagnóstico bastante difícil a não ser que haja antecedentes amebianos em outros órgãos.

Todas as infecções pela ameba *E. histolytica* devem ser tratadas, mesmo na ausência de sintomas, devido ao potencial risco de complicações futuras e de disseminação da ameba para os membros da família. Para tratamento das formas agudas e crônicas da amebíase intestinal e extraintestinal recomenda-se o uso de medicamentos que podem ser agrupados em duas classes, de acordo com o sítio de ação: amebicidas luminais, que atuam na luz do intestino, e amebicidas tissulares que atuam nos tecidos invadidos pelo parasita.

Os amebicidas luminais, principalmente as dicloracetamidas, são pouco absorvidas pela mucosa intestinal e sua ação limita-se à cavidade do intestino: atuam sobre os trofozoítos que estão na luz do tubo digestivo, mas não destroem seus cistos. Esses medicamentos apresentam baixa toxicidade para o homem e não têm contraindicações, podendo provocar flatulência como único efeito colateral. Entre os mais usados destacam-se: Teclosan; Etofamida; Fluorato de diloxamida ou Furamida; Clefamida; Paramomicina e o Iodoquinol. Dependendo da droga utilizada, recomenda-se de três a seis comprimidos por dia, por cinco a dez dias para adultos. Para as crianças, são indicadas suspensões com dosagens menores. Os amebicidas tissulares são absorvidos pelo intestino, agem sobre os parasitas encontrados nos tecidos e são as drogas utilizadas no tratamento das formas sintomáticas da amebíase. Os derivados de Nitroimidazóis são os quimioterápicos mais utilizados entre os amebicidas teciduais para o tratamento das formas invasivas. Entre eles, destacam-se: Metronidazol, Tinidazol, Ornidazol e Nimorazol ou Nitrimidazina.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Exame parasitológico de fezes

O diagnóstico laboratorial da amebíase foi realizado durante muito tempo apenas pelo exame parasitológico de fezes (EPF), um método que utiliza a microscopia óptica, no qual é realizada a pesquisa de formas evolutivas do complexo *E. histolytica/E. dispar* no sedimento fecal (Figuras 44.1 e 44.2 A e B). Essa pesquisa pode ser realizada em amostras frescas ou conservadas, utilizando métodos de concentração dos cistos

e trofozoítos, como o método de Faust e cols. e o método de Ritchie. Algumas colorações do sedimento fecal são utilizadas para melhorar a visualização das formas evolutivas, como a hematoxilina férrica e a tricrômica. Por esse método de coloração, apenas a visualização de trofozoítos contendo hemácias fagocitadas é capaz de identificar a espécie patogênica, visto que apenas a *E. histolytica* é capaz de causar lesões no hospedeiro e, consequentemente, a doença invasiva (WHO, 1997; Tanyuksel & Petri, 2003). No entanto, essa é uma característica raramente encontrada em amostras clínicas. Atualmente, muitos autores indicam a *E. moshkovskii* como uma espécie morfologicamente idêntica a *E. histolytica* e *E. dispar*, sugerindo a existência do complexo *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii*, que deve ser diferenciado (Fotedar e col., 2007a; Hamzah e col., 2010). A existência de outras espécies desse gênero que apresentam morfologia semelhante também tem demonstrado ser um fator responsável por resultados equivocados. Cistos imaturos de *E. coli* e estruturas maximizadas de *E. hartmanni* podem ser identificados erroneamente como *E. histolytica*, assim como cistos retraídos de *E. histolytica* também podem ser facilmente confundidos com *E. hartmanni*. Além disso, a técnica de EPF apresenta uma sensibilidade baixa, variando de 10% a 60% (Santos e col., 2007; Santos e col., 2013; Gomes e col., 2014). Fatores que influenciam nessa baixa sensibilidade são as condições de preservação da amostra clínica, o nível de proficiência dos profissionais que realizam a técnica e a intermitência da eliminação dos cistos pelo hospedeiro.

Nos casos de amebíase extraintestinal, pode-se pesquisar os trofozoítos da *E. histolytica* em materiais como escarro, vômitos e secreção puncionada de abcesso hepático. A pesquisa microscópica deve ser feita com material a fresco e corado com hematoxilina férrica ou tricrômico.

Métodos imunológicos

Técnicas capazes de identificar características antigênicas e genéticas de *E. histolytica* têm sido desenvolvidas como novas ferramentas de diagnóstico, na tentativa de distinguir *E. histolytica* das demais amebas não patogênicas. A importância do diagnóstico correto reside não apenas em dados epidemiológicos confiáveis, mas também evita o tratamento desnecessário em pacientes erroneamente diagnosticados com amebíase e permite o diagnóstico e tratamento correto nos casos sintomáticos.

Vários testes diagnósticos para detectar antígenos em materiais biológicos, como fezes, soro, fluido de abcesso e saliva, têm sido descritos. A detecção de antígenos em fezes, por exemplo, é tão sensível e específica quanto a cultura e a análise de isoenzimas. Alguns ensaios usam anticorpos policlonais capazes de se ligar a antígenos comuns à *E. histolytica* e *E. dispar*, logo sendo incapazes de diferenciar a espécie. A utilização de anticorpos monoclonais nesses ensaios permitiu a detecção de estruturas específicas de *E. histolytica* devido a pequenas diferenças que foram encontradas entre moléculas dessas duas espécies, como ocorre com a Gal/GalNAc lectina, que é geralmente o antígeno mais pesquisado. Esses ensaios podem ser feitos por intermédio de fitas imunocromatográficas ou por ensaio imunoenzimático (ELISA), e apresentam vantagens se comparados com outros métodos usados para o diagnóstico de amebíase. Algumas dessas vantagens são: a boa sensibilidade e especificidade, a disponibilidade de testes capazes de detectar o complexo *E. histolytica/E. dispar* e de testes específicos para *E. histolytica*, sua rapidez e a facilidade do método (Fotedar e col. 2007b; Santos e col., 2007).

Testes imunológicos para a detecção de anticorpos para a identificação da infecção por *E. histolytica* podem ser ferramentas de auxílio numa perspectiva diagnóstica em países onde a infecção pelo parasito não é endêmica. Alguns testes já foram padronizados com a proposta de detectar anticorpos específicos para antígenos de superfície de *E. histolytica*, conseguindo, desta forma, fazer a importante distinção entre *E. histolytica* e *E. dispar*, além de serem mais sensíveis que o exame parasitológico de fezes. A sua utilização é destinada principalmente a pacientes com suspeita de amebíase extraintestinal. O caráter agressivo da doença invasiva proporciona o contato dos parasitos com moléculas sistêmicas responsáveis por processos de inflamação e apresentação de antígenos para a construção de uma resposta imunológica específica do organismo hospedeiro, apresentando anticorpos específicos detectáveis no soro, o que facilita o diagnóstico da doença quando os indivíduos não mais apresentam parasitos detectáveis nas fezes. Em pacientes com abcesso hepático amebiano, a sensibilidade da detecção de anticorpos no soro, por exemplo, é de aproximadamente 100%. Um dos testes empregados é a detecção de anticorpo IgG anti-Gal/GalNAc lectina, devido a ser uma proteína da superfície do parasito (Fotedar e col. 2007b).

Técnicas moleculares – PCR

Durante a última década houve um desenvolvimento importante nos métodos baseados em biologia molecular para detecção e diferenciação das espécies do gênero *Entamoeba*. Vários trabalhos padronizando diferentes ensaios da reação em cadeia da polimerase (PCR) na diferenciação do complexo já são descritos na literatura, utilizando diferentes genes alvos, como o 18S rRNA, o que codifica para um antígeno de 30 kDa, proteína rica em serina, chitinase, hemolisina e o DNA circular extracromossomial. Atualmente algumas variações da técnica de PCR são descritas e utilizadas também na diferenciação das espécies do gênero *Entamoeba*, principalmente os métodos multiplex, que detectam mais de uma sequência de DNA em uma única reação. Com relação ao diagnóstico da amebíase, tem sido possível padronizar este tipo de reação para diferenciar principalmente *E. histolytica* de *E. dispar*, empregando iniciadores direcionados para os diferentes genes acima descritos ((Núñez e col., 2001). Além da Multiplex-PCR convencional, técnicas de PCR em tempo real empregando diferentes detectores (SYBR Green, TaqMan, Light Cycler) e sistema Luminex também foram descritas e demonstraram eficácia no diagnóstico diferencial da amebíase (Qvarnstrom e col., 2005; Hamzah e col., 2010; Haque e col., 2010; Santos e col., 2010; Santos e col., 2013; Gomes e col, 2014). Estudos que avaliaram os testes de detecção de antígeno e a PCR (PCR convencional, PCR-SHELA

e PCR em tempo real) concluíram que estes são adequados para o diagnóstico e que a escolha depende das condições econômicas e do tempo requerido para a resposta diagnóstica.

Cultura

Os meios de cultivo para *E. histolytica/E. dispar* podem ser: xênicos, com presença de flora bacteriana mista associada; monoxênico, com presença de um microrganismo associado; e axênico, isento de bactérias ou outros microrganismos associados no cultivo. O cultivo *in vitro* tem possibilitado o estudo de bioquímica, imunologia, produção de antígenos e anticorpos monoclonais e policlonais, caracterização isoenzimática de isolados, virulência e testes de sensibilidade *in vitro* para triagem de novos medicamentos.

Amebas Não Patogênicas do Intestino

Lenilza Mattos Lima

INTRODUÇÃO

Entamoeba coli, *Entamoeba hartmanni*, *Endolimax nana* e *Iodamoeba butschlii* são amebas geralmente consideradas não patogênicas, ditas comensais do intestino grosso, e se locomovem por pseudópodes. Todas têm distribuição mundial, sendo mais frequentemente encontradas em regiões tropicais e subtropicais. A presença dessas amebas comensais nos exames de fezes serve como indicador da exposição dos indivíduos a contaminação fecal de alimentos ou da água, não se exluindo a presença de outros parasitos, pois compartilham os mesmos meios de transmissão dos parasitos patogênicos. A *Entamoeba polecki* é uma ameba primária de porcos e macacos, mas também é encontrada no intestino humano, sendo usualmente considerada como parasito comensal. As infecções humanas são raras, e são mais prevalentes em áreas onde as pessoas têm contato com os animais. Alguns casos sintomáticos com fezes diarreicas devido à *E. polecki* foram relatados, com melhoras após o tratamento, mas a possibilidade de causar sintomas ainda é conflitante entre os autores.

Os cistos e trofozoítos destas espécies são eliminados nas fezes. A colonização das amebas não patogências ocorre após a ingestão de cistos maduros presentes nos alimentos ou água contaminados com resíduos fecais, e também nas mãos contaminadas. O excistamento ocorre no intestino delgado com liberação dos trofozoítos que migram para o intestino grosso. Os trofozoítos se multiplicam por divisão binária e produzem cistos. Por causa da proteção conferida por suas paredes celulares, os cistos podem sobreviver dias a semanas no ambiente externo e são responsáveis pela transmissão. Os trofozoítos eliminados nas fezes são rapidamente destruídos e, se ingeridos, não sobrevivem à exposição no meio gástrico.

O diagnóstico laboratorial é feito pela identificação de cistos e trofozoítos nos exames parasitológicos de fezes, por meio de técnicas de concentração e de coloração pelo Lugol e esfregaços permanentes corados (hematoxilina férrica e tricrômico). Os cistos normalmente são encontrados em fezes formadas e pastosas, enquanto os trofozoítos são encontrados em fezes diarreicas e, ocasionalmente, em fezes pastosas.

Entamoeba coli

Os cistos geralmente são esféricos, mas podem estar ovalados, e medem de 10 a 35 µm de tamanho. Apresentam um a oito núcleos, podendo ter dezesseis ou mais núcleos, com cariossoma grande e usualmente excêntrico (Figura 44.3). Corados pelo Lugol, o citoplasma tem tonalidade amarela, e os corpos cromatoides, quando presentes, são filamentosos, com extremidades afiladas. O citoplasma dos cistos pode conter vacúolo de glicogênio de forma difusa. É preciso fazer o diagnóstico diferencial com *Entamoeba histolytica/E.dispar* por meio da morfologia e do número de núcleos nos cistos.

Os trofozoítos medem de 15 a 50 µm de tamanho, com média de 20 a 25 µm. Emitem pseudópodes lentos, mais curtos e grossos. Nas preparações permanentes coradas (tricrômico), o núcleo é grande, apresenta cariossoma grande e excêntrico, com cromatina periférica grosseira e distribuída de forma irregular na membrana nuclear. O citoplasma não é diferenciado em ecto e endoplasma, apresenta granulação grosseira e tem vacúolos que podem conter bactérias (Figura 44.4).

Entamoeba hartmanni

Os cistos são esféricos e são semelhantes aos de *E. histolytica/E. dispar*, porém menores, medindo de 5 a 10 µm de tamanho. Corados pelo Lugol, os cistos têm de um a quatro núcleos, com cariossoma pequeno, discreto e central (Figura 44.5). O citoplasma pode conter glicogênio difuso. Corados pelo tricrômico, observa-se a cromatina periférica uniformemente distribuída em delicados grânulos. O citoplasma pode conter corpos cromatoides com extremidades arredondadas.

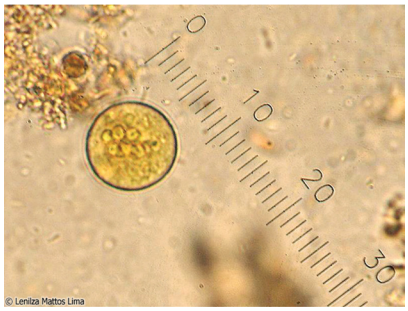


Figura 44.3 Cisto de *Entamoeba coli* corado pelo Lugol. Objetiva de 40× – escala ocular: fator de multiplicação 2,5.
Fonte: Lenilza Mattos Lima – http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br

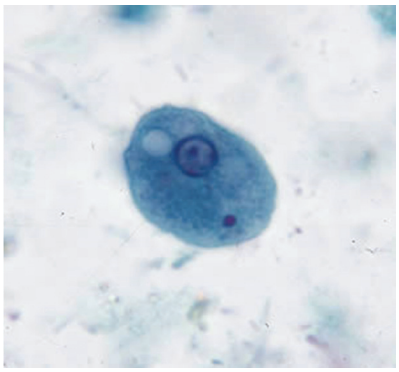


Figura 44.4 Trofozoíto de *Entamoeba coli* corado com tricrômico.
Fonte: http://www.cdc.gov/dpdx)

Os trofozoítos medem de 5 a 15 µm, com um tamanho médio de 8 a 10 µm. Corados com tricrômico, observa-se um único núcleo que contém um cariossoma pequeno, discreto e central, e cromatina periférica com grânulos finos e distribuídos de forma uniforme. O citoplasma é finamente granular e pode conter bactérias (Figura 44.6).

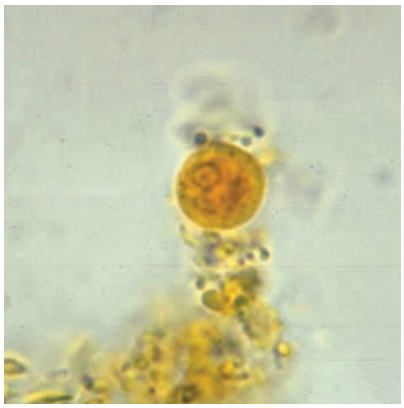


Figura 44.5 Cisto de *Entamoeba hartmanni* corado pelo Lugol.
Fonte: http://www.cdc.gov/dpdx)

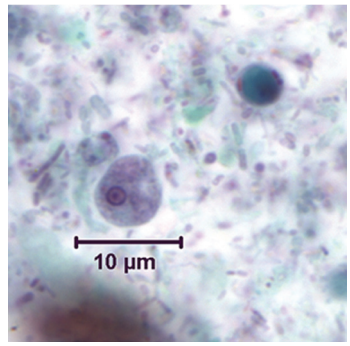


Figura 44.6 Trofozoíto de *Entamoeba hartmanni* corado com tricrômico.
Fonte: http://www.cdc.gov/dpdx)

Endolimax nana

Os cistos geralmente são esféricos ou ovais, mas podem ser elipsoides, e medem de 5 a 12 µm de tamanho. Quando corados pelo Lugol, apresentam citoplasma de coloração verde-clara e contêm de um a quatro núcleos pouco visíveis, em virtude de seu pequeno tamanho (Figura 44.7). Corados pelo tricrômico, o cariossoma é grande e irregular, membrana nuclear fina e ausência de cromatina periférica na membrana nuclear.

Os trofozoítos medem de 6 a 12 µm de tamanho. Corados pelo tricrômico, o núcleo apresenta cariossoma grande e irregular, central ou excêntrico, com membrana nuclear fina e ausência de cromatina periférica na membrana nuclear (Figura 44.8). O citoplasma apresenta granulação grosseira e tem muitos vacúolos que podem conter bactérias. Pode ser difícil distinguir os trofozoítos de *E. nana* daqueles de *Iodamoeba butschlii*

Figura 44.7 Cistos de *Endolimax nana* corados pelo Lugol.
Fonte: (Cortesia: Profª Lenilza Mattos Lima)

Iodamoeba butschlii

Os cistos podem ser esféricos ou ovais e medem de 5 a 20 µm de tamanho. Possuem um núcleo com cariossoma grande e central, membrana espessa e sem cromatina periférica.

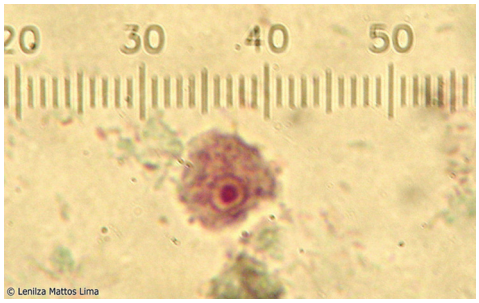


Figura 44.8 Trofozoíto de *Endolimax nana* corado pelo tricrômico. Objetiva de 100× – escala ocular: fator de multiplicação 1.
Fonte: Lenilza MattosLima (http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br)

O núcleo não é visível em preparações coradas pelo Lugol (Figura 44.9), porém visível pelo tricrômico (Figura 44.10). Os cistos possuem um grande vacúolo de glicogênio com limites nítidos e corados em castanho-avermelhado pelo Lugol (Figura 44.9).

Os trofozoítos medem de 8 a 20 μm de tamanho e, corados pelo tricrômico, possuem um único núcleo com cariossoma grande e central, sem cromatina periférica. O citoplasma é granular, vacuolizado e pode conter bactérias. Pode ser difícil distinguir os trofozoítos de *I. butschlii* daqueles de *E. nana*.

Figura 44.9 Cisto de *Iodamoeba butschlii* corado pelo Lugol. Objetiva de 40× – escala ocular: fator de multiplicação 2,5.
Fonte: Lenilza Mattos Lima (http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br).

Entamoeba polecki

Os cistos medem de 9 a 25 μm de tamanho e geralmente são uninucleados, porém cistos binucleados podem raramente ser observados. O cariossoma é pleomórfico e pode ser pequeno, grande e compacto ou difuso, e com localização central ou excêntrica. A cromatina periférica pode ser delicada ou grosseira, e tem distribuição uniforme (Figura 44.11). Corados pelo tricrômico, o citoplasma mostra numerosos corpos cromatoides, os quais podem ser pequenos e redondos ou grandes com extremidades redondas ou mais afiladas. Os trofozoítos são muitas vezes arredondados, medindo de 10 a 25 μm. O único núcleo é muitas vezes distorcido e de forma irregular, com um cariossoma pequeno e puntiforme localizado centralmente. A cromatina periférica é geralmente delicada e uniforme. O citoplasma é muitas vezes vacuolado com uma margem hialina.

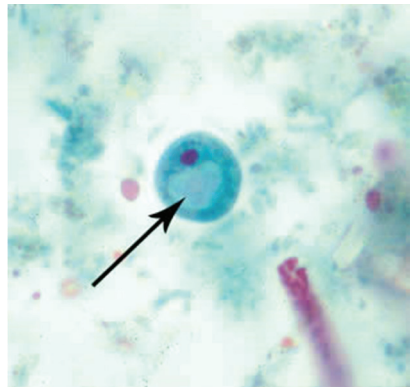


Figura 44.10 Cisto de *Iodamoeba butschlii* corado com tricrômico. O núcleo é visível e o vacúolo de glicogênio (seta) não se cora.
Fonte: http://www.cdc.gov/dpdx

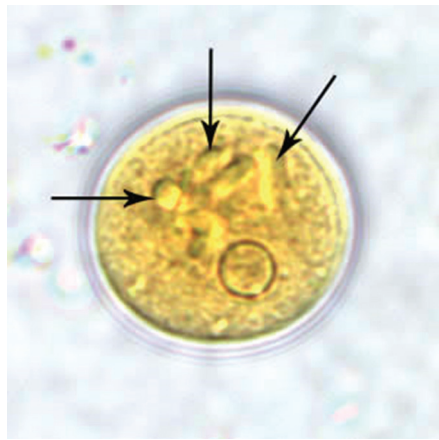


Figura 44.11 Cisto de *Entamoeba polecki* corado pelo Lugol. Observar os numerosos corpos cromatoides (seta).
Fonte: http://www.cdc.gov/dpdx

Giardia Lamblia

Karin Silva Caumo ▪ Lenilza Mattos Lima

INTRODUÇÃO

A *Giardia lamblia* (sin. *G. duodenalis* e *G. intestinalis*) é um protozoário flagelado do intestino delgado do homem, de animais domésticos (cães e gatos) e de diversos animais silvestres. A giardíase é uma das infecções gastrintestinais parasitárias mais comuns em crianças, como também de diarreia em viajantes. A transmissão ocorre por via fecal-oral, frequentemente através da ingestão de água e alimentos contaminados e contato de pessoa a pessoa.

A giardíase é uma parasitose amplamente distribuída pelo mundo, com a ocorrência de mais de 280 milhões de casos anuais na África, Ásia e América. Em 2004, a OMS incluiu a giardíase na lista das doenças tropicais negligenciadas. A prevalência da giardíase é de 2% a 7% em países desenvolvidos, enquanto pode variar entre 20% e 30% em países em desenvolvimento. No Brasil, a prevalência varia de 4% a 30% de acordo com o tipo de estudo, região estudada, condições socioeconômicas, culturais e a faixa etária dos indivíduos envolvidos, com maior ocorrência em crianças com idade entre 0 e 10 a 12 anos.

A compreensão da epidemiologia da giardíase depende da caracterização de *G. lamblia,* que é um complexo multiespécies. Atualmente, com o uso de métodos moleculares, observa-se uma ampla diversidade genética dentro das populações do gênero, com sete espécies reconhecidas e oito genótipos (A-H), identificados a partir de vários grupos de hospedeiros vertebrados. Os genótipos A (subgenótipos A–I e A–II) e B são os mais frequentemente relacionados a infecções no homem, porém também evidenciados em mamíferos como cães, gatos e bovinos. Os genótipos A e B apresentam potencial zoonótico e uma ampla especificidade de hospedeiros.

MORFOLOGIA

A *Giardia lamblia* apresenta um ciclo de vida simples, com duas formas evolutivas, o cisto e o trofozoíto. Ambas as formas podem ser eliminadas nas fezes. Os cistos são ovais ou elipsoides e raramente arredondados, medindo cerca de 8 a 19 µm de comprimento e 7 a 10 µm de largura. Apresentam uma membrana externa fina, que poderá se apresentar destacada do citoplasma. No interior do cisto, as estruturas apresentam-se duplicadas em relação ao trofozoíto, contendo 2 ou 4 núcleos, um número variável de fibrilas (axonemas) e os corpos medianos em forma de meia-lua, situados no polo oposto aos núcleos. Os cistos quando corados pela solução de iodo, podem apresentar uma tonalidade pardacenta, esverdeada, pardo-esverdeada e castanho-amarelada; os axonemas e os corpos parabasais coram-se em negro (Figura 44.12).

Figura 44.12 Cisto de *Giardia lamblia* corado pelo Lugol.
Fonte: Cortesia da Profª. Drª.Karin Silva Caumo - Laboratório Didático de Parasitologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas da UFSC.

O trofozoíto apresenta forma piriforme, medindo 10 a 20 µm de comprimento por 5 a 15 µm de largura. Apresenta simetria bilateral, com estruturas celulares duplas, isto é, dois núcleos, dois axonemas e oito flagelos (quatro flagelos laterais, dois centrais e dois caldais), cada um originando-se de um blefaroplasto. Os trofozoítos possuem uma face convexa dorsalmente e côncava ventralmente, e nesta superfície há uma concavidade ovoide, conhecida como disco adesivo ou suctorial. Ainda na parte ventral, encontram-se uma ou duas formações paralelas, em forma de vírgula, conhecidas como corpos medianos. Quando corados (Figura 44.13), observam-se dois núcleos redondos ou ovoides, um de cada lado da linha mediana, com grande cariossoma redondo, sem cromatina periférica. Os flagelos são visíveis nos trofozoítos vivos ou por colorações específicas.

Figura 44.13 Trofozoíto de *Giardia lamblia* corado pelo tricrômico. Aumento de 1.000×.
Fonte: Profª Lenilza Mattos Lima (http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br).

TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA

A *G. lamblia* apresenta vários ciclos de transmissão, incluindo formas zoonóticas, antroponóticas, hídrica e alimentar. A giardíase é transmitida através dos cistos, que poderão ser ingeridos por contato direto, via fecal-oral, por ingestão de água sem tratamento ou insuficientemente tratada, por alimentos contaminados (frutas e verduras mal lavadas), de pessoa a pessoa, por meio de mãos contaminadas, em locais de aglomeração humana (creches, orfanatos, asilos) e por contato com animais domésticos. Ainda, os cistos podem ser veiculados por insetos como moscas e baratas. As infecções podem resultar da ingesta de apenas dez ou menos cistos.

Após a passagem dos cistos pelo estômago, a ação das enzimas digestivas provoca o desencistamento, dando origem aos trofozoítos, que emergem dos cistos e estabelecem a infecção, encontrando-se livres na luz intestinal ou fixos na parede duodenal pelo disco suctorial. Os trofozoítos vivem no duodeno e nas primeiras porções do jejuno. A reprodução dos trofozoítos é por divisão binária longitudinal. O ciclo se completa pelo encistamento do parasito e sua eliminação para o meio externo. Os cistos são liberados intermitentemente pelas fezes, tornando-se imediatamente infecciosos, capazes de permanecer por meses em condições adequadas de temperatura e umidade. Os cistos são, altamente resistentes à cloração da água e condições adversas do ambiente, como dessecação.

PATOGENIA E ASPECTOS CLÍNICOS

A patogenia está relacionada com o número de trofozoítos de *G. lamblia* que colonizam o intestino delgado, cepa do protozoário como também fatores inerentes ao hospedeiro, entre eles a deficiência de IgA e IgE e estado nutricional. Os parasitos, quando presentes em grande número, causam ação irritativa sobre a mucosa intestinal, levando à alterações na produção de enzimas digestivas (dissacaridases) e formam uma barreira mecânica, como um tapete em todo o duodeno, dificultando a absorção de vitaminas lipossolúveis, ácidos graxos, vitamina B12, ácido fólico e ferro. Com essa deficiência na absorção, acumula-se na luz do intestino um elevado teor de gorduras, o que pode gerar um quadro de esteatorreia. Pode ocorrer hipersecreção de cloreto na luz intestinal, e esse fator, associado à má absorção, parece ser o responsável pelo acúmulo de líquido no intestino, resultando em diarreia grave e crônica.

Os trofozoítos fortemente aderidos ao epitélio intestinal podem causar lesões nas microvilosidades, tornando-as achatadas ou atrofiadas. Sugere-se que a *G. lamblia* possivelmente produza e libere substâncias citopáticas na luz intestinal. Na giardíase, o parasito pode alterar o epitélio intestinal sem que haja invasão tissular, ou seja, a *G. lamblia* ocasiona lesões sem penetrar no epitélio, sem invadir tecidos vizinhos, ou cair na corrente sanguínea.

O intervalo entre a infecção e o aparecimento dos sintomas de giardíase costuma ser de duas semanas a meses. As manifestações clínicas variam desde infecções assintomáticas a quadros de diarreia aguda autolimitada ou crônica. Dos sintomas mais frequentes observados em casos de giardíase estão: evacuações líquidas ou pastosas, número aumentado de evacuações, irritabilidade, insônia, náuseas, vômitos, mal-estar, cólicas abdominais, flatulência, perda de apetite, que pode estar acompanhada ou não de emagrecimento. Infecções crônicas podem levar a perda de peso, má absorção, e podem ser confundidas com doença inflamatória intestinal ou anorexia nervosa. Em crianças, a giardíase crônica está associada à baixa estatura, baixo peso e déficit cognitivo. A infecção por *G. lamblia* torna-se mais severa em pacientes imunocomprometidos.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Exame parasitológico de fezes (EPF)

O diagnóstico parasitológico é realizado pela demonstração de cistos e trofozoítos nas fezes. Os cistos geralmente são encontrados nas fezes da maioria dos indivíduos com giardíase, seja sintomática ou assintomática, enquanto o encontro de trofozoítos ocorre em infecções sintomáticas. Por isso, é muito importante observar o aspecto e consistência das fezes, pois informa sobre a maneira de proceder com a amostra e o estágio evolutivo a ser pesquisado, uma vez que em fezes diarreicas ou líquidas são encontrados os trofozoítos, em fezes pastosas, os cistos e ocasionalmente os trofozoítos, e nas fezes formadas apenas os cistos.

- **Pesquisa de cistos em fezes formadas ou pastosas:** podem ser detectados em preparações a fresco pelo método direto, porém os métodos de escolha são os de concentração, como o método de Faust e cols. (centrífu-

go-flutuação em solução de sulfato de zinco), de Ritchie (centrífugo-sedimentação em formalina-éter) e de Lutz ou Hoffman, Pons e Janer (sedimentação espontânea em água). Utiliza-se a coloração pelo Lugol.

- **Pesquisa de trofozoítos em fezes diarreicas ou líquidas:** como os trofozoítos são destruídos em poucos minutos no meio externo (15 a 20 minutos), recomenda-se coletar o material no laboratório para análise imediata ou adicionar conservante (SAF, Formol a 10%, MIF). Utiliza-se o método direto a fresco ou corado pelo Lugol, e ainda podem ser empregadas colorações permanentes, como hematoxilina férrica ou tricrômico (Figura 44.13).
- **Comentários:** muitos dos resultados obtidos para a pesquisa de *G. lamblia* pelo EPF podem ser falso-negativos, pois, durante a infecção, a eliminação de cistos é intermitente, isto é, os pacientes com giardíase poderão ter períodos negativos de eliminação dos cistos, com intervalos que variam de 7 a 9 dias. Para diminuir a probabilidade de resultado falso-negativo, recomenda-se realizar o exame de três ou seis amostras fecais, em dias alternados.

Outros métodos

Em casos de indivíduos com manifestações clínicas de giardíase, porém com exames de fezes negativos, recomenda-se a análise de amostras do fluido duodenal ou biópsia do duodeno para a pesquisa de trofozoítos. Os trofozoítos geralmente são visualizados por exame direto a fresco em lâmina, ou através de um método alternativo disponível comercialmente, o método da cápsula duodenal (*Entero Test*®).

Métodos imunológicos

Atualmente vários métodos imunológicos foram propostos para a detecção de antígenos de *G. lamblia* em amostras fecais (coproantígenos), como as técnicas de Elisa, imunofluorescência direta e imunocromatografia. Estes métodos são úteis, pois são de simples execução, alta sensibilidade e especificidade. A detecção de coproantigenos por Elisa tem demonstrado resultados satisfatórios, com sensibilidade que varia de 85% a 100% e especificidade de 90% a 100%, ajudando no diagnóstico por eliminação de resultados falso-negativos que ocorrem nos exames microscópicos.

A detecção de anticorpos anti-*Giardia* no soro pelos métodos de Elisa e imunofluorescência indireta têm apresentado problemas relacionados com a ocorrência de resultados falso-positivos. Os anticorpos IgG permanecem elevados por muito tempo no soro do paciente após a cura, impedindo a distinção entre infecções passadas e recentes.

Técnicas moleculares

Os métodos moleculares são pouco utilizados na rotina de diagnóstico laboratorial, porém são amplamente utilizados para a diferenciação de espécies e classificação genotípica de *Giardia,* identificadas a partir de amostras clínicas e ambientais. O estudo de vários genes a partir da amplificação do DNA de *G. lamblia* por PCR e sequenciamento permitiu entender um pouco mais sobre a biologia, epidemiologia, ecologia, população genética, prevenção e controle da giardíase.

Chilomastix Mesnili

Lenilza Mattos Lima

■ INTRODUÇÃO

Chilomastix mesnili é um protozoário flagelado do intestino do homem e geralmente considerado não patogênico. Habita o ceco e/ou colo. Os cistos e trofozoítos de *C. mesnili* são eliminados nas fezes. A infecção ocorre por via fecal-oral, pela ingestão de cistos em água ou alimentos contaminados, mãos ou fômites contaminados. O excistamento ocorre no intestino com liberação de trofozoítos

Esse protozoário tem distribuição mundial e sua presença em amostras de fezes pode, contudo, ser um indicador de contaminação fecal de alimentos ou água, não se excluindo a presença de outros parasitos, pois compartilha os mesmos meios de transmissão dos parasitos patogênicos. Os animais podem servir como um reservatório para *Chilomastix*.

■ DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial é feito pela identificação de cistos e trofozoítos nos exames parasitológicos de fezes, por meio de técnicas de concentração e de coloração pelo Lugol e esfregaços permanentes corados (hematoxilina férrica e tricrômico). Os cistos são piriformes, com aspecto característico de limão, raramente arredondados, medindo de 6 a 10μm × 4 a 6 μm (Figura 44.14 A e B). Os cistos possuem um núcleo bem visível e coloração verde azeitona pelo Lugol. O citóstoma in-

vaginado pode ser observado no cisto. Os trofozoítos medem de 10 a 20μm de comprimento, têm corpo piriforme e assimétrico, sendo a extremidade posterior mais afilada, terminando em delgada ponta. Possuem quatro flagelos e um grande citóstoma alongado. Um único núcleo redondo fica situado na porção anterior, e tem cariossoma pequeno (Figura 44.15).

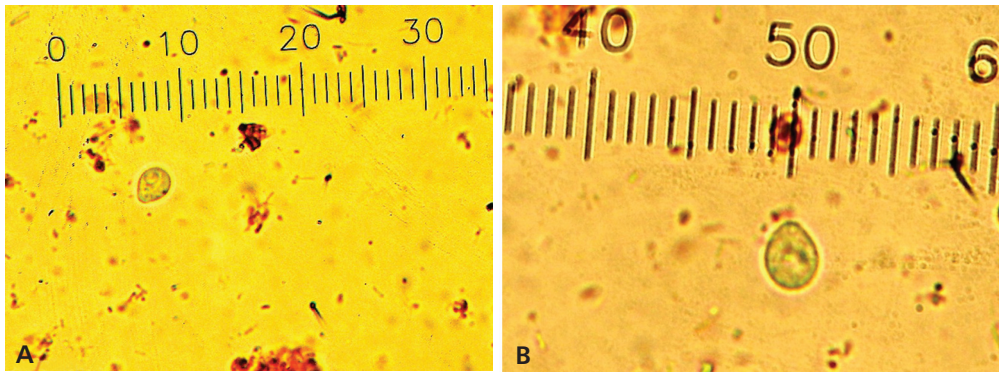


Figura 44.14 **(A** e **B)** Cistos de *Chilomastix mesnili* corados pelo Lugol. Objetiva de 40× Escala ocular – fator de multiplicação 2,5.
Fonte: (Cortesia de Lenilza Mattos Lima).

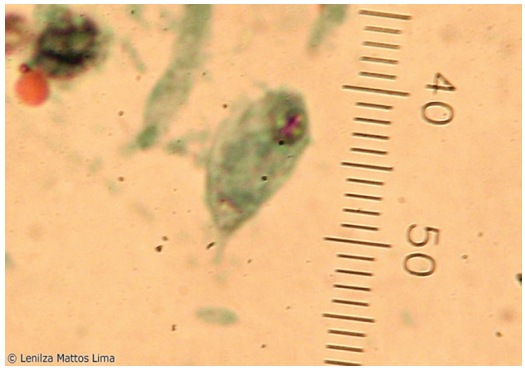


Figura 44.15 Trofozoíto de *Chilomastix mesnili* corado pelo tricrômico. Objetiva de 100×. Escala ocular – fator de multiplicação 1.
Fonte: Lenilza Mattos Lima (http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br).

Cyclospora Cayetanensis

Alexandre Januário da Silva

INTRODUÇÃO

Cyclospora cayetanensis é um protozoário pertencente ao Filo Apicomplexa, da subclasse Coccidiasina, família Eimeridae, que causa uma enfermidade intestinal conhecida como ciclosporíase humana. O primeiro caso de ciclosporíase humana foi na verdade publicado por Asford, em 1979, que identificou o protozoário como um microrganismo similar aos coccídeos em fezes de três indivíduos da Papua, Nova Guiné. Mesmo assim, outros investigadores pensaram que os oocistos esporulados eram mais semelhantes a cianobactérias, e o nome de "corpo cianobactéria-*like*" ou CLB tornou-se predominante na literatura. Entretanto, em 1992, Ortega e colaboradores publicaram um resumo em congresso indicando que haviam

conseguido executar, em condições laboratoriais, a esporulação desse microrganismo. Foi criado um táxon independente para esse coccídeo. A descrição completa da morfologia e todos os detalhes até então obtidos sobre a biologia desse protozoário foi feita em 1994 pelo mesmo grupo de pesquisadores, e o protozoário foi incluído no gênero *Cyclospora*. O nome da espécie, "cayetanensis" foi dado em homenagem à Universidade Cayetano Heredia, em Lima, Peru, na qual foram obtidos os isolados originais estudados, além de ter sido palco para alguns dos estudos biológicos que foram determinantes para a sua caracterização e classificação. Até o momento, ainda não se descobriu outra espécie desse mesmo gênero que possa causar a doença em humanos. As espécies do gênero *Cyclospora* que são mais próximas filogeneticamente da *C. cayetanensis* foram descobertas em símios. Isto é, *C. papionis*, *C. colobi* e *C. cercopithecci* foram descritas em babuínos, macaco colobus e macaco verde, por Eberhard e colaboradores em 1999. Essas espécies são morfologicamente idênticas à *C. cayetanensis*, mas se diferenciam em nível das sequências que codificam para a unidade de 18S do rRNA ribossomal. No entanto, a biologia da *Cyclospora cayetanensis* continua sendo desconhecida em vários aspectos. Por exemplo, ainda se desconhece o mecanismo utilizado pelo parasita para executar a esporulação em condições ambientais. Também não se sabe efetivamente qual é a dose infecciosa do parasita e tampouco se a *C. cayetanensis* pode ou não causar doença sintomática em animais. Todo o esforço científico para se perpetuar a *C. cayetanensis in vivo* ou *in vitro* não resultaram em modelos viáveis para o cultivo do parasito.

TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA

O oocisto de *C. cayetanensis* é eliminado nas fezes ainda na forma imatura, não infectante. Por essa razão, acredita-se que a transmissão direta via fecal-oral de um indivíduo infectado para um não infectado não seja possível. Esse aspecto diferencia a *C. cayetanensis* de outro importante coccídio, o *Cryptosporidium* spp., que pode ser transmitido diretamente de pessoa a pessoa. Após a eliminação nas fezes, acredita-se que o oocisto inicia sua maturação no ambiente e, assim, ocorre a esporulação do oocisto entre 10 a 15 dias, resultando na divisão do esporonte em dois esporocistos, cada um contendo dois esporozoítos. A infecção ocorre pela ingestão de oocistos esporulados do protozoário. Hortaliças, frutas e até mesmo água servem como veículos para a transmissão da ciclosporíase. Dentro do intestino, os esporocistos liberam os esporozoítos, que invadem as células epiteliais e passam por uma fase de multiplicação assexuada e depois por uma fase de desenvolvimento de formas sexuadas. As formas sexuadas se fundem dando origem a um zigoto que irá se desenvolver em um oocisto não esporulado. Os oocistos não esporulados serão excretados nas fezes. Os oocistos são resistentes e existem indicações de que os mesmos se mantêm viáveis durante meses.

EPIDEMIOLOGIA

As infecções por *C. cayetanensis* têm ampla distribuição mundial e ocorrem em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo mais frequentes nas regiões de clima tropical e subtropical, com relatos de alta ocorrência em pacientes com HIV/AIDS e diarreia. As pessoas que viajam ou vivem em países onde a ciclosporíase é endêmica têm grande risco de adquirir a infecção. A maioria dos indivíduos sem patologias que afetem o sistema imunológico poderão se recuperar dessa parasitose sem tratamento específico. Se não for tratada, a doença pode durar de alguns dias a meses. A melhor maneira de se proteger contra a ciclosporíase seria evitando alimentos ou água que pudessem ter sido contaminados com oocistos desse protozoário. Devido à falta de modelos experimentais para testar a viabilidade dos oocistos, não está claro quais seriam os tipos de tratamento eficazes para se inativar o parasito. Entretanto, acredita-se que o tratamento com cloro ou iodo é improvável para matar oocistos de *C. cayetanensis.* Também não existe vacina disponível para a prevenção da ciclosporíase humana.

O impacto dessa parasitose tem sido grande em alguns países industrializados como os Estados Unidos e Canadá. As epidemias de ciclosporíase têm sido cada vez mais frequentes. Durante alguns anos essa doença foi negligenciada, mesmo depois de epidemias multiestaduais que ocorreram nos meados dos anos 90. Recentemente, entre 2013 e 2015, nos Estados Unidos, epidemias de dimensões ainda maiores que as ocorridas anteriormente chamaram a atenção tanto do Centers for Disease Control and Prevention (CDC) como do U.S. Food and Drug Admnistration (U.S. FDA), que têm papéis fundamentais no campo de segurança de alimentos. Tanto o CDC como o U.S. FDA estão atuando consistentemente para elucidar e controlar esses surtos epidêmicos. Existe uma série de lacunas em relação à epidemiologia da *C. cayetanensis*. Por exemplo, ainda não foi identificado nenhum reservatório zoonótico para o protozoário. Também não se conhece o mecanismo pelo qual a *C. cayetanensis* contamina os alimentos, ou seja, se é durante a irrigação das hortaliças ou na colheita. O CDC monitora a ocorrência de ciclosporíase nos Estados Unidos e ajuda os departamentos estaduais de saúde a identificar e investigar surtos de ciclosporíase. O U.S. FDA, com seu Centro para Segurança Alimentar e Nutrição Aplicada (CFSAN), contribui com guias práticos e recomendações detalhadas de segurança alimentar para os produtores e fornecedores. No guia para minimizar riscos microbianos de segurança alimentar para frutas e legumes frescos, o CFSAN descreve boas práticas agrícolas e boas práticas de fabricação para frutas e vegetais frescos. As orientações abrangem os processos de crescimento, colheita, classificação, embalagem e de armazenagem, e seguir as orientações pode ajudar a reduzir o risco total de contaminação microbiana durante esses processos. A detecção da *C. cayetanensis* em alimentos ainda representa um desafio, mas métodos moleculares vêm sendo desnvolvidos para esse fim.

PATOGENIA E ASPECTOS CLÍNICOS

A *C. cayetanensis* causa inflamação do intestino delgado, alterações na mucosa com atrofia das vilosidades e hiper-

plasia das criptas intestinais. As infecções podem ser assintomáticas e já foram descritas infeções assintomátricas até em crianças. Clinicamente, a ciclosporíase é semelhante à criptosporidíase, cistoisosporíase, giardíase e microsporidíase. O diagnóstico laboratorial é importante para a identificação do agente etiológico. Após um período de incubação de mais ou menos uma semana a dez dias, os sintomas se manifestam com diarreia aquosa, explosiva, que pode ser bastante grave. Outros sintomas incluem anorexia, perda de peso, dor abdominal, náuseas e vômitos, mialgias, febre baixa e fadiga. Em indivíduos imunocompetentes a doença pode ser autolimitada. Os sintomas em um indivíduo infectado podem reincidir, e o tratamento com medicamento antidiarreico poderá ajudar a reduzir os sintomas de diarreia. As pessoas com a saúde debilitada ou que tenham o sistema imunológico deprimido podem desenvolver doença grave e crônica. Esse aspecto vem sendo observado consistentemente nas epidemias de ciclosporíase estudadas nos Estados Unidos. Em pacientes com infecção por HIV/AIDS, a ciclosporíase causa diarreia aquosa intermitente, com 1 a 8 evacuações diárias, e o quadro clínico é grave quando o número de linfócitos CD4 é inferior a 200/mm³. Diagnosticar a ciclosporíase somente com base nos aspectos clínicos é bem difícil, mas, em certos casos, é possível, como nos casos associados a surtos epidêmicos. Ainda assim, esses casos diagnosticados clinicamente são considerados suspeitos ou presuntivos com base na definição de caso publicada pelo CDC. A aplicação de técnicas de laboratório adequadas é essencial para o diagnóstico definitivo da ciclosporíase.

O tratamento da ciclosporíase se faz com a administração de Trimetoprim/sulfametoxazol (TMP/SMX), vendido sob os nomes comerciais Bactrim, Septra e Cotrim. Esse é o tratamento usual para a infecção e, até o momento, não existe um medicamento alternativo que possa curar infecções causadas por *C. cayetanensis*. O desenvolvimento de fármacos para essa doença infecciosa tem sido dificultado pela não existência de modelos *in vivo* ou *in vitro* para o cultivo da *C. cayetanensis*. Por essa razão, os indivíduos que não respondem ao tratamento padrão ou têm alergia a sulfa, precisam utilizar o tratamento sintomático, especialmente nos casos de infecções graves. Nesses casos, os sintomas intestinais podem levar mais de um mês para desaparacerem.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Para o diagnóstico, as amostras devem ser coletadas e enviadas para o laboratório tão rapidamente quanto possível. Uma vez que uma variedade de ensaios pode ser aplicada, é recomendável que diferentes porções da mesma amostra sejam preservadas de acordo com o teste a ser realizado. Por exemplo: fixadas em formol a 10% (para microscopia direta, procedimentos de concentração e preparação de esfregaços corados), fixadas em 2,5% de dicromato de potássio (para ensaios de esporulação), ou congeladas sem fixação para o diagnóstico molecular.

Exame parasitológico de fezes

A demonstração microscópica de oocistos é a base para o diagnóstico clínico da ciclosporíase. A coloração de Kinyoun ou da safranina modificada é atualmente considerada a técnica padrão ouro para o diagnóstico microscópico. Os oocistos imaturos de *C. cayetanensis* medem aproximadamente 9 a 10 μm de tamanho e têm a aparência esférica. Pelo Kinyoun, os oocistos coram-se do rosa ao vermelho, sobre um fundo de coloração azul ou verde (Figura 44.16); pela safranina, a coloração varia do vermelho a um vermelho-alaranjado. É importante realizar a morfometria com o micrômetro ocular. Uma vez que os oocistos podem ser eliminados em pequenas quantidades e de forma intermitente nas fezes, recomendam-se exames de fezes repetidos juntamente com os procedimentos de concentração de oocistos. Se os exames de fezes forem negativos, pode ser necessário o exame de espécimes duodenais por biópsia ou sequência de teste (Enterotest®). Os oocistos também podem ser visualizados em exame a fresco, por microscopia de campo brilhante com contraste de interferência diferencial (DIC) e com microscopia de fluorescência utilizando luz ultravioleta (UV) (Figuras 44.17 e 44.18). Os oocistos da *C. cayetanensis* conseguem produzir uma autofluorescência quando irradiados com luz UV. O microscópio a ser utilizado nesse exame precisa ser equipado para a microscopia de fluorescência com filtros de excitação de 330 a 365 nm. Nesse caso, os oocistos aparecem em azul ou verde contra um fundo preto ou azul escuro (Figura 3). Se esse conjunto de filtros não estiver disponível, uma fluorescência verde menos intensa pode ser obtida com excitação azul na faixa de 450 a 490 nm.

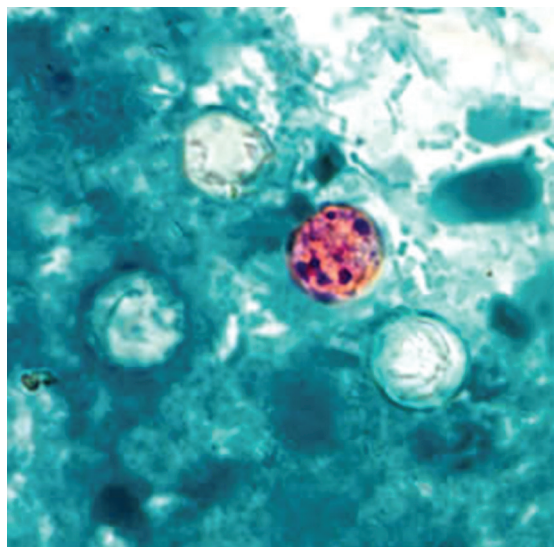


Figura 44.16 Oocistos de *Cyclospora cayetanensis* corados com coloração ácido-resistente. Notar que alguns oocistos não coram integralmente.

Fonte: Imagem capturada com magnificação de 1.000×. http://www.cdc.gov/dpdx/cyclosporiasis/index.html

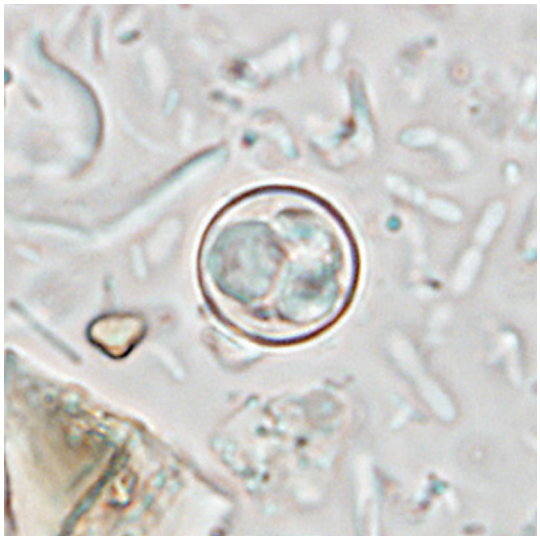


Figura 44.17 Oocisto de *Cyclospora cayetanensis* em exame a fresco de fezes.
Fonte: Imagem capturada com magnificação de 1.000×. http://www.cdc.gov/dpdx/cyclosporiasis/index.html

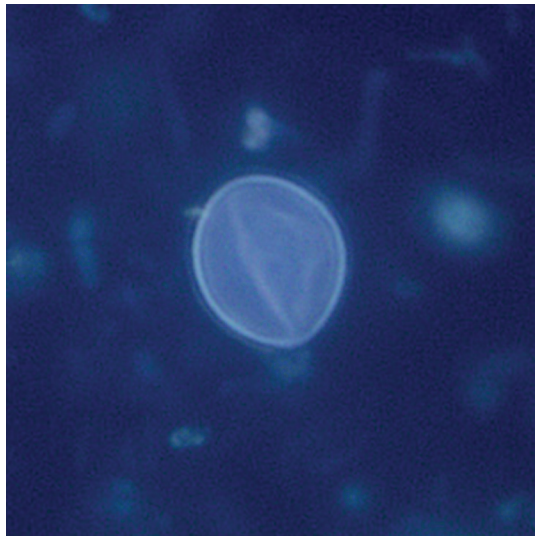


Figura 44.18 Oocisto com autofluorescência de *Cyclospora cayetanensis* em microscopia UV. Para essa técnica, o microscópio precisa ser equipado para microscopia de fluorescência com filtros de excitação UV fixado em 330 a 365 nm. Imagem capturada com magnificação de 1.000×.
Fonte http://www.cdc.gov/dpdx/cyclosporiasis/index.html

Técnicas moleculares

Reação em cadeia da polimerase – PCR

Os testes moleculares estão cada vez mais sendo utilizados nos países industrializados para o diagnóstico dessa parasitose. As plataformas normalmente utilizam a reação encadeada por polimerase (PCR) com reagentes específicos para a amplificação de fragmentos dos genes do parasita. Nos Estados Unidos, o uso da PCR para o diagnóstico clínico da ciclosporíase tem sido visto nos laboratórios públicos e privados. Atualmente, plataformas como o "FilmArray® GI Panel", atualmente produzido pela Biomerrieux (http://www.biomerieux-diagnostics.com/filmarrayr-gi-panel), estão disponíveis comercialmente nos Estados Unidos, aprovadas para uso em diagnóstico clínico pelo U.S. FDA. Essa plataforma permite a identificação simultânea diagnóstica de 22 patógenos intestinais, incluindo os protozoários parasitas *Cryptosporidium* spp., *C. cayetanensis*, *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*. Os avanços na genômica de *C. cayetanensis* irão provavelmente criar novas perspectivas para o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares para a detecção diagnóstica desse parasito. Um esboço do genoma da *C. cayetanensis* foi recentemente publicado e está disponível no GenBank e em outros bancos de dados, como o EMBL, sob o número de acesso LIGJ00000000.

Cryptosporidium spp.

Alexandre Januário da Silva

■ INTRODUÇÃO

O gênero *Cryptosporidium* do filo Apicomplexa, inclui pelo menos 25 espécies que causam a doença intestinal chamada criptosporidiose em seres humanos e animais. A primeira espécie desse gênero, *C. muris,* foi descrita por Tyzzer em uma publicação de 1910, descrevendo o parasito nas glândulas gástricas de camundongo. Tyzzer descreveu todas as fases evolutivas do *Cryptosporidium* e observou que as mesmas apresentavam uma membrana limitante relativamente fina, durante as distintas fases de desenvolvimento. Descreveu também a organização interna dos oocistos; ou seja, cada oocisto continha quatro esporozoítos, que mediam cerca de dez mi-

crômetros de comprimento, fusiformes, sem estrutura interna demonstrável. O *C. muris*, a espécie tipo do gênero, e todas as outras espécies que foram descritas posteriormente seguem padrões biológicos e morfológicos semelhantes.

Casos de criptosporidiose humana não foram identificados até 1976, quando Nime e colaboradores descreveram a doença em uma criança de três anos de idade, que apresentava sintomas graves de infecção gastrintestinal. Após exames de radiografia intestinal, a paciente foi diagnosticada com grandes quantidades de gás no colo, com altos níveis de fluidos presentes tanto no intestino grosso como no intestino delgado. Para verificar a causa desses sintomas, vários exames foram feitos. Foram então demonstrados organismos esféricos ou ovoides, que nos lumens da cripta estavam ligados à superfície apical das células epiteliais, e estágios de reprodução sexuada e assexuada foram identificados. A paciente pode ter se infectado através da ingestão de água de um poço que abastecia a comunidade ou mesmo por contato com inúmeros gatos, cães, gado e não lácteos nas proximidades.

TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA

O oocisto de *Cryptosporidium* possui um envoltório externo impermeável a uma série de ações químicas, que lhe permite sobreviver fora do corpo do hospedeiro por longos períodos de tempo em condições ambientais adversas. Os oocistos de *Cryptosporidium* se diferem dos outros coccídios por não dependerem do processo de esporulação para se tornarem infectantes, ou seja, os oocistos de *Cryptosporidium* são infectantes quando eliminados nas fezes dos hospedeiros infectados. Assim, os oocistos de *Cryptosporidium* podem ser transmitidos diretamente de um hospedeiro a outro sem a necessidade de um veículo de transmissão. Acredita-se que, juntamente com outros atributos biológicos, esses fatores foram essenciais para a grande dispersão desse parasito em animais e em seres humanos.

Oocistos esporulados, contendo quatro esporozoítos são excretados pelo hospedeiro infectado através das fezes e possivelmente outras rotas, como secreções respiratórias. Ocasionalmente fontes de alimentos podem servir como veículos de transmissão. Muitos surtos nos Estados Unidos ocorreram em parques aquáticos, piscinas, comunidades e creches. As transmissões zoonóticas e antroponóticas de *C. parvum* e a transmissão antroponótica de *C. hominis*, respectivamente, podem ocorrer através da exposição às fezes de animais ou seres humanos infectados ou exposição à água contaminada por fezes contendo oocistos. Após a ingestão (e possivelmente inalação) por um hospedeiro adequado, ocorre a excistação. Os esporozoítos são liberados e parasitam as células epiteliais do trato gastrintestinal ou de outros tecidos, como o trato respiratório. Nessas células, os mesmos iniciam a multiplicação assexuada (esquizogonia ou merogonia) e, em seguida, a maturação sexual (gametogonia). Após a fertilização dos macrogametas pelos microgametas, os oocistos se desenvolvem no hospedeiro infectado. Dois tipos de oocistos são produzidos: o de parede espessa, que é comumente excretado do hospedeiro, e o oocisto de parede fina, que por autoinfecção amplifica a infecção dentro do hospedeiro. Oocistos são infectantes na excreção, permitindo, assim, a transmissão fecal-oral direta e imediata.

EPIDEMIOLOGIA

A criptosporidiose humana é uma das principais doenças parasitárias de transmissão hídrica em países desenvolvidos. Estima-se que aproximadamente 8.000 casos de criptosporidiose ocorram anualmente somente nos Estados Unidos. Duas espécies desse gênero estão associadas com a maioria dos surtos epidêmicos de criptosporidiose. Essas espécies são *C. hominis* e *C. parvum*, que podem infectar humanos imunocompetentes. Essas duas espécies são morfologicamente idênticas, mas se diferem em nível genético e epidemiológico.

A aplicação do conceito de genótipo é de grande importância no estudo da criptosporidiose humana e veterinária. Alguns estudos mostram que os diferentes genótipos de espécie *C. parvum* possuem epidemiologias bem distintas, como no caso dos genótipos encontrados preferencialmente em certos animais. O *C. hominis* é considerado uma espécie totalmente antroponótica, e, até o momento, ainda não foram registradas infecções naturais zoonóticas causadas por essa espécie. Já o *C. parvum* pode tanto infectar humanos como animais. Entretanto existem dados científicos indicando que o *C. parvum* que infecta predominantemente os humanos é geneticamente distinto de outros genótipos de *C. parvum*, ou seja, este seria um genótipo antroponótico de *C. parvum*. Também foram descritas espécies zoonóticas morfologicamente semelhantes ou até idênticas ao *C. parvum* que podem infectar humanos em condições especiais. Por exemplo, o *C. felis*, que foi identificado em humanos imunocomprometidos pela primeira vez por Pieniazek e colaboradores. Nesse estudo, ferramentas moleculares foram utilizadas para identificar a espécie de *Cryptosporidium*, tendo sido a primeira descrição desta espécie em associação com infecção humana. O nome *C. felis* foi dado em função da identificação desta espécie ter sido feita pela primeira vez em gatos domésticos. Na verdade, a maioria das espécies zoonóticas de *Cryptosporidium* foram definidas taxonomicamente com base no hospedeiro em que foram primeiramente encontradas, como, por exemplo, *C. canis* e *C. meleagridis*, que inicialmente foram descritas em cães e peru, respectivamente. Entretanto, a exemplo de *C. felis*, essas espécies já foram diagnosticadas em humanos que sofriam algum tipo de imunodeficiência. O *C. felis* também já foi verificado em gado, o que leva a crer que essas espécies de *Cryptosporidium* morfologicamente idênticas ao *C. parvum* podem ter uma epidemiologia muito mais complexa do que se estima, podendo infectar um número relativamente grande de hospedeiros animais.

Desde 1976, um número alto de casos de criptosporidiose vem sendo identificados. O maior surto já registrado ocorreu em 1993 em Milwaukee, em que se estima ter afetado 400.000 pessoas, criando um impacto gigantesco na economia e na saúde pública da cidade. Quando esse surto foi estudado originalmente, não foi possível identificar de forma definitiva a espécie ou genótipo do *Cryptosporidium* associado ao evento e foi assumido que o surto havia sido causado por *C. parvum*. Anos depois foi possível se determinar, por meio de análises genéticas, que o surto havia sido associado à transmissão de *C. hominis*. Esses dados foram importantes para concluir as hipóteses epidemiológicas de que o surto havia sido causado por contaminação humana e não por contaminação animal. Vários surtos epidêmicos da doença foram investigados em vários países do mundo. No Brasil, um dos surtos bem estudados ocorreu em São Paulo, que

envolveu crianças de uma creche hospitalar. Nesse estudo foi determinado que o surto foi causado por *C. hominis*, com base na análise de regiões genômicas de microssatélites. Esses dados foram cruciais para eliminar fontes zoonóticas de contaminação. Assim, a epidemiologia molecular tem uma função importante em vários aspectos relacionados ao estudo da criptosporidiose. As ferramentas de epidemiologia molecular, muitas vezes, são essenciais para determinar a fonte inicial de contaminação nas investigações epidemiológicas e dar suporte a medidas para controlar surtos epidêmicos que possam ocorrer no futuro.

Existe um número relativamente grande de genótipos de *C. parvum* e também outras espécies que podem possuir um perfil epidemiológico distinto. Este campo de estudo é muito abrangente e continua em constante evolução. O uso da genômica aplicada aos estudos biológicos e epidemiológicos irá provavelmente contribuir para elucidar esses aspectos a partir de uma ótica mais consistente. Até então, a maioria dos dados moleculares foram obtidos no estudo das espécies de *Cryptosporidium* com base no sequenciamento isolado de genes que codificam para o rRNA ou genes que codificam para proteínas específicas.

■ PATOGENIA E ASPECTOS CLÍNICOS

A patogenia e o quadro clínico dependem tanto da virulência do parasito quanto da habilidade de resposta imune do indivíduo infectado. O principal sintoma é diarreia aquosa, podendo ter episódios de evacuação de 3 a 10 vezes por dia. Podem estar presentes dor abdominal, náusea, flatulência, febre baixa, dor de cabeça e anorexia. Em indivíduos imunocompetentes é uma infecção autolimitada, com cura espontânea em duas a três semanas. Já em bebês e crianças, os sintomas podem ser mais graves e podem ser acompanhados de vômitos e desidratação, sendo que, no mundo, a criptosporidiose é responsável por 30% a 50% das mortes em crianças menores de 5 anos de idade. Em indivíduos imunodeficientes pode ocorrer síndrome de má absorção devido à interferência do parasito no funcionamento das células intestinais, causando acentuada perda de peso. Nesses casos, os sintomas podem se tornar crônicos, caracterizando-se por vários meses de diarreia aquosa, que, por vezes, pode ser refratária aos tratamentos existentes, apresentando mortalidade elevada. Na criptosporidiose grave, o número de linfócitos CD4 é inferior a 200/mm^3. Além disso, os indivíduos HIV positivos podem apresentar formas extraintestinais da infecção, em que as vias e a vesícula biliar, o pâncreas e o sistema pulmonar podem ser afetados.

■ DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da criptosporidiose pode ser feito por meio do exame microscópico (morfologia) ou por uso de testes imunológicos ou moleculares.

Exame parasitológico das fezes

A microscopia ainda é considerada o padrão ouro no diagnóstico laboratorial da criptosporidiose e é utilizada mundialmente. A técnica de coloração mais utilizada para o diagnóstico laboratorial é a coloração de Kinyoun modificada, a mesma recomendada para evidenciar a morfologia dos oocistos de *Cyclospora cayetanensis* em fezes humanas. É importante ressaltar que existe uma série de espécies de *Cryptosporidium* que são morfologicamente idênticas. Assim, a microscopia não tem especificidade para gerar uma identificação diagnóstica em relação a espécie. Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. medem aproximadamente 4 a 6 μm de tamanho, são esféricos e apresentam quatro esporozoítos no seu interior. Pelo Kinyoun, os oocistos coram-se do rosa ao vermelho, sobre um fundo de coloração azul (Figura 44.19). Pela safranina, a coloração varia do vermelho a um vermelho-alaranjado. É importante realizar a morfometria com o micrômetro ocular. Os oocistos de *Cryptosporidium* sp em amostras de fezes frescas ou em meio de armazenamento permanecem infectantes por longos períodos. Portanto as amostras de fezes devem ser preservadas em formol a 10% tamponado ou em solução de acetato de sódio-ácido acético-formalina (SAF). O tempo de contato com formalina necessário para inviabilizar os oocistos não é claro, assim é normalmente sugerido um período de pelo menos 18 a 24 horas para obter uma margem de segurança. Além disso, devem ser adotadas as medidas de segurança habituais para o manuseio de material potencialmente infeccioso. Métodos de concentração de fezes podem ser usados para melhorar o perfil de detecção do exame microscópico. Esses métodos ajudam a separar o excesso de detritos fecais, possibilitando campos microscópicos menos densos e auxiliando na identificação do protozoário, especialmente nas amostras com baixa carga parasitária. A concentração pelo método do acetato de etila e formalina é bastante utilizada no diagnóstico microscópico das infecções parasitárias como a criptosporidiose e ciclosporíase, bem como de infecções causadas por helmintos.

Métodos imunológicos

Para uma maior sensibilidade e especificidade, a microscopia de imunofluorescência é um ótimo método de escolha, seguido de perto por imunoensaios enzimáticos. O teste de imunofluorescência direta tem sido amplamente utilizado, bem como os ensaios imunoenzimáticos (Elisa). Esses testes (Figura 44.20) estão disponíveis comercialmente em formas de *kits* de diagnóstico, o que facilita o procedimento e controle de qualidade. Entretanto esses testes não garantem um diagnóstico laboratorial em relação à espécie, semelhante ao que acontece com a aplicação diagnóstica da microscopia.

■ MÉTODOS IMUNOCROMATOGRÁFICOS PARA *CRYPTOSPORIDIUM E GIARDIA*

Os métodos imunocromatográficos são de grande utilidade no diagnóstico da criptosporidiose, pois são testes de execução e interpretação simples e que garantem a obtenção dos resultados em pouco mais de 10 minutos, incluindo o tempo que se leva para a preparação da amostra a ser testada. Esses testes são comercializados na forma de kits e vem sendo utilizados largamente em vários países devido a alta sensiblidade oferecida. O formato mais popular dentro dos laboratórios de análises clínicas é um teste imunocromatográfico que detecta a presença de antígenos de *Giardia* e *Cryptosporidium* spp. em amostras de fezes. Esse teste contém um cartucho ou cassete contendo anticorpos específicos para antígenos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia*. Embora somente uma amostra possa ser testada em cada cassete, esses kits incluem todos os reagentes

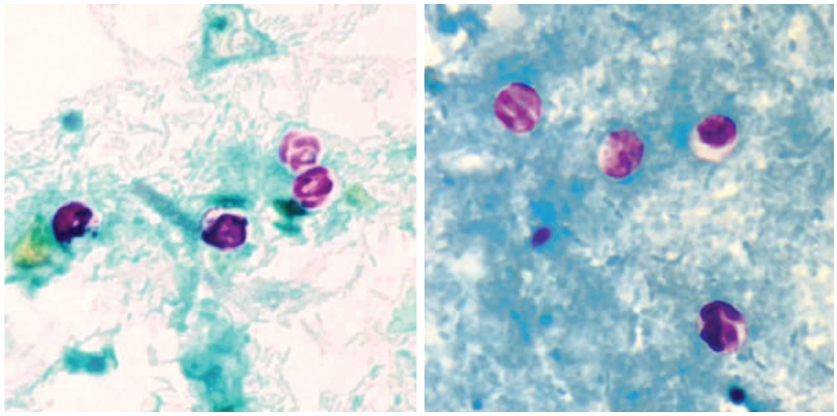


Figura 44.19 Oocistos de Cryptosporidium parvum corados pela coloração de Kinyoun modificada. Nessa coloração, os oocistos corados em um tom vermelho-rosado brilhante se destacam contra um fundo azul. Os esporozoítos são visíveis no interior dos dois oocistos à direita nesta imagem.
Fonte: http://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html.

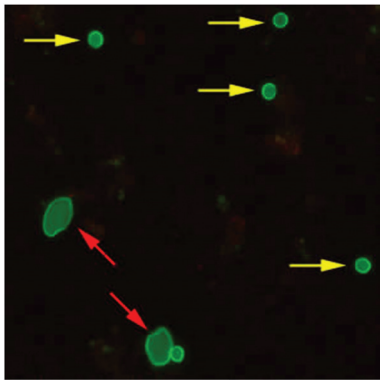


Figura 44.20 Oocistos de *Cryptosporidium* spp. (setas amarelas) e cistos de *Giardia duodenalis* (setas vermelhas) identificados com o teste de imunofluorescência direta (anticorpos marcados com fluorocromo fluoresceína).
Fonte: http://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html.

e suprimentos necessários para preparar e testar as amostras e 30 cassetes de reação. A presença desses antigenos nas amostras geram complexos antígeno-anticorpo que são precipitados em regiões específicas do cartucho, permitindo a visualização de uma linha de reatividade. Para os testes imunocromatográficos em geral, não é necessário o uso de aparelhos específicos para a visualização e interpretação dos resultados.

Métodos moleculares

Os testes moleculares estão, aos poucos, sendo mais utilizados no diagnóstico de rotina da criptosporidiose. Isso porque somente por meio desses testes é que se pode com segurança determinar a espécie infectante. Essa determinação não tem uma importância clínica, tendo em vista que o tratamento da criptosporidiose não se altera de acordo com a espécie infectante. Entretanto a identificação da espécie é de grande relevância nos estudos epidemiológicos e na identificação das fontes de contaminação para o controle de epidemias.

Cystoisospora Belli

Lenilza Mattos Lima

INTRODUÇÃO

No gênero *Cystoisospora,* a espécie clinicamente mais importante para o ser humano é a *Cystoisospora belli*, anteriormente denominado *Isospora belli,* e foi descoberta por Woodcok em 1915 e descrita por Wenyon em 1923. Esse protozoário pertence ao reino Protista, filo Apicomplexa, subclasse Coccidiasina e família Eimeriidae. É um pequeno coccídio intracelular que infecta as células epiteliais do intestino delgado do homem, causando a cistoisosporíase, doença

caracterizada por diarreia aquosa e persistente. O ser humano é a única fonte reconhecida de infecção por *C. belli*.

As infecções por *C. belli* têm ampla distribuição mundial e ocorrem em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo mais frequentes nas regiões de clima tropical e subtropical. As áreas de maior prevalência da infecção incluem parte da América Central, América do Sul, África e Sudeste da Ásia, com relatos de alta ocorrência em pacientes com HIV/AIDS e diarreia. A prevalência da infecção varia de 8% a 20% na África e no Haiti, variando de 0,2% a 3% em países desenvolvidos como os Estados Unidos. No Brasil, diferentes trabalhos têm relatado taxas de prevalência variando entre 2% a 10% para *C. belli* em pacientes com HIV/AIDS e quadros diarreicos. Atualmente, com a introdução do tratamento antirretroviral (TARV), tem sido relatada uma diminuição da prevalência de infecções por *C. belli*. Isso pode ser explicado pela consequente melhora da resposta do sistema imunológico do paciente. Em adição, muitos efeitos colaterais causados pelo TARV tornam difícil a adesão do paciente ao tratamento. Assim, a menor ou maior prevalência de infecções por *C. belli* pode estar relacionada ao tratamento TARV ou com a irregularidade ou ausência do TARV, e, ainda, com o uso ou ausência de tratamento com Trimetoprim/sulfametoxazol (TMP/SMX).

A cistoisosporíase ocorre em pacientes imunodeprimidos, especialmente aqueles com HIV/AIDS. Também tem sido relatada em indivíduos imunocompetentes, assim como em pacientes com outras imunodeficiências celulares, tais como leucemia linfoblástica, doença de Hodgkin e linfoma não Hodgkin. Atinge os indivíduos de todas as faixas etárias e ambos os sexos, com relatos de surtos de diarreia em creches e instituições para doentes mentais e na diarreia do viajante em áreas endêmicas.

MORFOLOGIA

Os oocistos de *C. belli* são tipicamente elipsoides e apresentam as extremidades afuniladas, mas podem ser ovais, e medem de 20 a 33 μm de comprimento por 10 a 19 μm de largura. A membrana cística é dupla, porém fina, lisa e hialina. Quando eliminados nas fezes, os oocistos são imaturos e contêm um esporoblasto no seu interior (Figura 44.21). Depois da excreção, os oocistos amadurecem formando dois esporoblastos (Figura 44.22). Os oocistos maduros de *C. belli* contêm dois esporocistos e quatro esporozoítos em cada esporocisto.

A distinção entre os oocistos de *C. belli* e do *Sarcocystis* spp. (S. *hominis* e *S. suihominis*), que também habitam o intestino humano, é feita pelo tamanho e pelo grau de maturação dos oocistos. Os oocistos de *Sarcocystis* spp. nas fezes humanas medem de 15 a 20 μm de comprimento por 8 a 10 μm de largura. Além disso, a maturação dos oocistos de *Sarcocystis* spp. se completa no epitélio intestinal, e como a membrana envoltória do oocisto é muito delicada e frágil, ela facilmente se rompe, aparecendo nas fezes os dois esporocistos juntos ou isolados, cada um contendo quatro esporozoítos e um corpo residual refráctil. É importante realizar a morfometria com o micrômetro ocular.

TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA

A transmissão ocorre por contaminação fecal-oral. O homem pode se infectar pela ingestão de oocistos esporulados presentes em água e alimentos contaminados. Após a ingestão de oocistos maduros, os esporocistos são liberados, sofrem ruptura e deixam livres os esporozoítos, que penetram nas células epiteliais do intestino delgado. Inicia-se a reprodução esquizogônica com formação dos esquizontes contendo vários merozoítos. Com a ruptura da célula parasitada, os merozoítos são liberados e invadem novas células, repetindo-se o ciclo assexuado. Alguns merozoítos sofrem diferenciação morfológica, transformando-se em células sexuadas, chamadas gametócitos (micro e macrogametócito) que, por reprodução sexuada, evoluem e formam os gametas. Após a fecundação, forma-se a célula ovo ou zigoto, que adquire uma membrana cística, formando o oocisto. Na luz intestinal, o oocisto imaturo, contendo um esporoblasto, é eliminado com as fezes. A maturação do oocisto pode ocorrer em 2 a 3 dias, podendo permanecer viável no meio ambiente por meses. O esporoblasto se divide em dois esporoblastos, os quais segregam uma membrana resistente em torno de si, formando dois esporocistos; ocorre uma nova divisão nuclear com formação dos esporozoítos. Após tornar-se maduro, o oocisto de *C. belli* contém dois esporocistos e quatro esporozoítos em cada esporocisto, sendo a forma infectante para o ser humano.

PATOGENIA E ASPECTOS CLÍNICOS

C. belli é considerado um patógeno oportunista. A patogenia e o quadro clínico da doença dependem da resposta imune do indivíduo infectado. As principais alterações visualizadas ao microscópio em amostras de biópsia do intestino delgado são caracterizadas pela atrofia das vilosidades intestinais, hipertrofias das criptas e infiltração celular da lâmina própria, podendo existir número elevado de eosinófilos juntamente com presença intensa de células plasmáticas, linfócitos e leucócitos polimorfonucleares. No entanto, esses achados na cistoisosporíase não são específicos e, em muitos casos, são leves ou até ausentes. É rara a ocorrência de cistoisosporíase com localização extraintestinal. Os poucos casos descritos foram em pacientes com AIDS e revelaram a presença de cistos unizoicos extraintestinais em linfonodos mesentéricos, no baço, no fígado e na vesícula biliar. Segundo os autores, estes sítios podem representar possíveis focos de reservatórios de *C. belli*, colonizando novamente o intestino, causando recrudescência da doença. Em adição, podem também ser possíveis focos de resistência do parasito e associados a recidivas da infecção, mesmo após o paciente ter sido tratado com medicação específica. Segundo alguns autores, a via linfática ou sanguínea podem servir como via de disseminação do parasito.

Clinicamente, a cistoisosporíase é semelhante à criptosporidíase, ciclosporíase, giardíase e microsporidíase. O diagnóstico laboratorial é de grande relevância na identificação do agente etiológico. Os sintomas da cistoisosporíase aparecem em torno de uma semana após a ingestão dos oocistos. A doença é caracterizada por diarreia, dor abdominal, náuseas,

vômitos, febre, anorexia, perda de peso e desidratação. Nos pacientes imunocompetentes, a infecção pode ser assintomática ou ser revelada por sinais e sintomas mais leves, com diarreia de curta duração. A doença é autolimitada num período de 10 a 14 dias, e raramente crônica. Os pacientes imunodeprimidos, especialmente pacientes com HIV, manifestam sintomas graves que podem persistir durante meses, com diarreia crônica e desidratação. É importante ressaltar a gravidade e o maior risco de infecção por *C. belli* em pacientes com AIDS e com número de células CD4 inferior a 200 células/mm^3, e que muitas vezes não utilizam o tratamento antirretroviral altamente potente e efetivo. Esses pacientes apresentam diarreia aquosa e intensa, com 8 a 10 evacuações diárias, acompanhadas por má absorção e esteatorreia. A perda de líquidos nas fezes é ao redor de 2 litros por dia, levando a grande perda de peso, grave desidratação e desnutrição. Em alguns pacientes com *C. belli* observa-se eosinofilia no hemograma. O tratamento é realizado com Trimetoprim/Sulfametoxazol (TMP/SMX). A doença pode ser fatal se não for tratada e, por outro lado, também pode ser reativada. Em indivíduos com AIDS já foram descritos casos de colecistite acalculosa.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Exame parasitológico de fezes

Os oocistos de *C. belli* são identificados ao exame microscópico das fezes frescas ou conservadas, utilizando-se os métodos e técnicas parasitológicas de rotina, com ou sem coloração pelo Lugol. Os oocistos geralmente aparecem com um esporoblasto (Figura 44.21), mas podem ser vistos com dois esporoblastos (Figura 44.22). Recomenda-se o exame de amostras múltiplas, no mínimo três em dias alternados, e método de concentração, tendo em vista a eliminação intermitente dos oocistos e a pequena quantidade dos mesmos na amostra fecal. Os métodos mais utilizados são: centrífugo-flutuação em solução de sacarose de Sheater, centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco (densidade 1,18 g/mL) e centrífugo-sedimentação em sistema formalina-éter ou formalina-acetato de etila, aumentando-se, assim, a probabilidade de resultados positivos na detecção das formas parasitárias. A utilização combinada de métodos de concentração e técnica de coloração facilita a detecção de oocistos de *C. belli*.

Entre as colorações, destacam-se a coloração pela safranina, e as derivadas da fucsina-fenicada: Kinyoun modificado, Ziehl-Neelsen modificado e DMSO-fucsina-fenicada. Nas colorações derivadas da fucsina-fenicada, os oocistos imaturos apresentam-se corados do rosa ao vermelho, ao púrpura intenso, sobre um fundo de coloração azul ou verde (Figura 44.23). Pela coloração da safranina modificada, os oocistos aparecem corados do vermelho a um brilhante vermelho-alaranjado. O protozoário pode ser identificado nos esfregaços permanentes corados pelo tricrômico (Figura 44.24). Os cristais de Char-

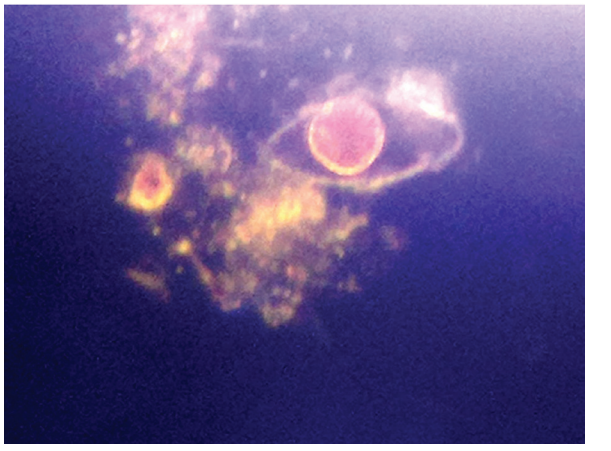


Figura 44.21 Oocisto imaturo de *Cystoisospora belli* com um esporoblasto. Objetiva de 40×. Microscópio de contraste de fase.
Fonte: (Imagem capturada no Laboratório de Parasitologia Clínica do ACL/UFSC pela Profª Lenilza Mattos Lima).

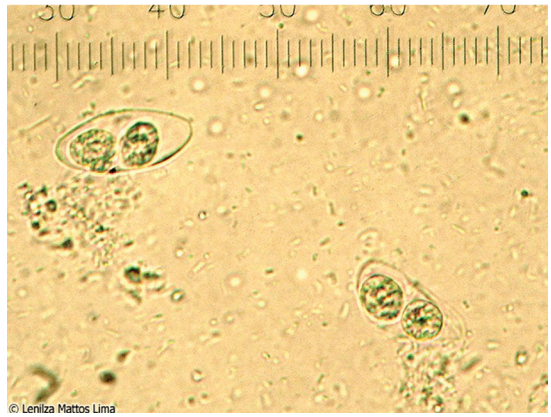


Figura 44.22 Oocistos imaturos de *Cystoisospora belli* com dois esporoblastos. Objetiva de 40× com escala ocular: fator de multiplicação 2,5.
Fonte: Lenilza Mattos Lima (http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br).

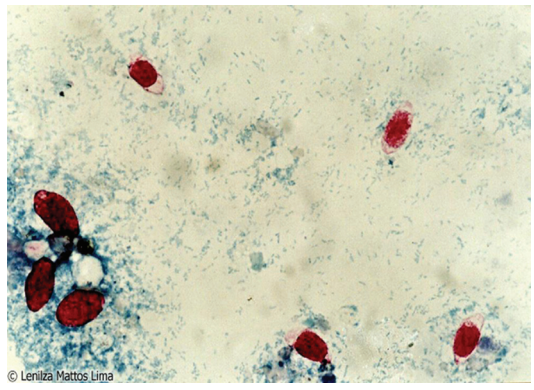


Figura 44.23 Oocistos imaturos de *Cystoisospora belli*. Notar oocistos completamente corados (à esquerda). Coloração derivada da fucsina-carbonicada. Objetiva de 20×.
Fonte: Lenilza Mattos Lima (http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br).

cot-Leyden são comumente observados nas fezes, mas é rara a presença de sangue e leucócitos. *C. belli* também pode ser identificada em associação com os outros dois coccídios intestinais: *Cryptosporidum* spp. e *Cyclospora cayetanensis*.

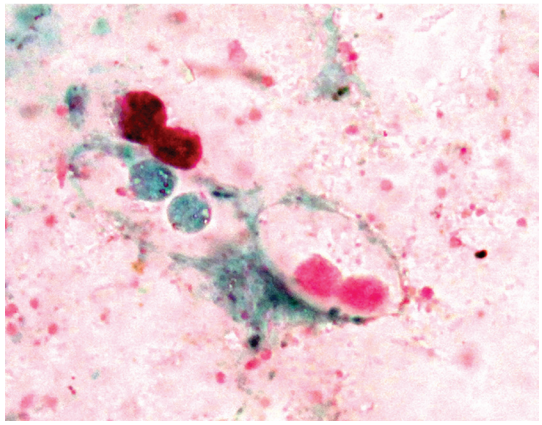


Figura 44.24 Oocistos imaturos de *Cystoisospora belli* com dois esporoblastos. Coloração pelo tricrômico. Objetiva de 40×.
Fonte: (Imagem capturada no Laboratório de Parasitologia Clínica do ACL/UFSC pela Profª Lenilza Mattos Lima).

Os aspirados do duodeno ou amostras de biópsias do intestino delgado podem ser utilizados quando existe suspeita de infecção e os exames de fezes são negativos.

Técnicas moleculares: Reação em cadeia da polimerase – PCR

Vários trabalhos descritos na literatura mostram que a PCR em tempo real na amostra fecal é uma valiosa ferramenta de diagnóstico para estudos epidemiológicos. Em adição, tem o potencial de detectar infecções por *C. belli* em pacientes com número muito baixo de oocistos nas fezes, permitindo aumentar a probabilidade de diagnóstico de cistoisosporíase no laboratório clínico, em particular na diarreia de viajantes. É uma ferramenta de diagnóstico promissora.

Outras técnicas de diagnóstico

Os oocistos podem ser diagnosticados pela microscopia de fluorescência pela luz ultravioleta, exibindo uma brilhante e visível autofluorescência em azul intenso (filtro de excitação de 330 a 380 DM) quando submetidos à ação da luz ultravioleta. Até o momento não foram desenvolvidas técnicas imunológicas promissoras para diagnosticar a *C. belli*.

Blastocystis spp.

Lenilza Mattos Lima ▪ Karin Silva Caumo

INTRODUÇÃO

O *Blastocystis* é um protozoário unicelular que habita o trato intestinal dos seres humanos e animais. É o agente etiológico da blastocistose. Estudos relatam que existem pelo menos 13 linhagens geneticamente distintas, mas até agora nove subtipos (genótipos) de *Blastocystis* foram descritos, com base na análise de subunidades ribossomais pequenas do gene RNA (SSU rRNA), cada um deles com características diferentes. Provavelmente cada subtipo demonstra a sua própria patogenicidade, e, portanto, é necessário conhecer os subtipos específicos de cada região. Pela atual convenção, qualquer dessas espécies em humanos seria identificada como *Blastocystis hominis* quando presentes em amostras fecais. Entretanto, devido a essa grande diversidade, sugere-se que atualmente o parasito seja referido como *Blastocystis* spp.

Em 1911, Alexeleff criou o gênero *Blastocystis*, e, em 1912, Brumpt detectou o organismo no material fecal humano e definiu a espécie como *Blastocystis hominis*, o qual foi por muito tempo classificado como fungo ou levedura. Em 1976, Zierdt & Tan reclassificaram e incluíram esse parasito entre os protozoários. Recentemente, baseado em estudos moleculares, *Blastocystis* spp. foi incluído no grupo Stramenopiles, um ramo da Chromalveolata. No entanto, várias questões sobre esse protozoário ainda necessitam ser esclarecidas, especialmente nos aspectos relacionados a taxonomia, biologia e patogenia.

Além do ser humano, a infecção por *Blastocystis* spp. foi relatada em animais como répteis, suínos, aves e mamíferos, incluindo animais domésticos e de companhia. Os seres humanos podem ter infecções zoonóticas. A blastocistose humana tem ampla distribuição mundial, ocorrendo nas regiões tropicais e subtropicais, apresentando maior prevalência nos países em desenvolvimento, cujos índices podem variar de 30% a 60%. Nos países desenvolvidos, esses índices costumam estar entre 1,5% a 10%. O *Blastocystis* spp. é considerado o mais comum dos protozoários encontrados em amostras de fezes humanas. No Brasil, ainda é pequeno o número de publicações que registram as taxas de prevalência de *Blastocystis*

spp. em amostras fecais de indivíduos imunocompetentes e pacientes imunodeprimidos. Notavelmente, muitos laboratórios não registram a presença de *Blastocystis* por causa da visão de longa data de que é um organismo não patogênico, ou ainda por falta de conhecimento do pleomorfismo do *Blastocystis* spp. na identificação microscópica.

MORFOLOGIA

Blastocystis spp. são organismos polimórficos que apresenta quatro formas clássicas descritas na literatura: vacuolar, granular, ameboide e cística. A forma vacuolar é esférica, às vezes com aspecto irregular, sendo caracterizada por um grande vacúolo central (corpo central) e medindo de 2 a 200 μm de diâmetro, com média de 4 a 15 μm de diâmetro, visualizando-se uma fina borda de citoplasma com um a quatro núcleos e muitos grânulos. É a forma mais comum e mais típica encontrada nas amostras de fezes e em meios de cultivo (Figura 44.25 A, B, C). A forma granular é rara em amostras fecais, sendo mais comum em meios de cultura. Apresenta muitos grânulos no vacúolo central, diferenciando da forma vacuolar. Seu tamanho varia de 15 a 25 μm de diâmetro e possui de um a quatro núcleos. A visualização da forma ameboide é mais frequente em meios de cultura, mas também é observada nas fezes. Tem forma irregular e lobulada, mede de 3 a 8 μm de diâmetro, tem de um a três núcleos centrais, ausência de vacúolo, e possui estruturas semelhantes a pseudópodes. É comum a presença de bactérias em seu citoplasma.

A forma cística foi recentemente descrita e mede de 2 a 5 μm de diâmetro. O cisto é esférico ou oval, possui uma parede cística de múltiplas camadas, e no citoplasma são observados de um a quatro núcleos, vacúolos pequenos e inclusões. Nos exames de fezes também podem ser observadas as formas multivacuolar e avacuolar. A forma multivacuolar é menor que a forma vacuolar, medindo de 5 a 8 μm de diâmetro. Possui um a dois núcleos no citoplasma e vários vacúolos pequenos. A forma avacuolar foi descrita em amostras de fezes diarreicas e em material de colonoscopia. Mede aproximadamente 5 μm de diâmetro, com um a dois núcleos, e se caracteriza pela ausência de vacúolo central.

TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA

Os cistos excretados com as fezes do hospedeiro são as formas infectantes do parasito, e a transmissão ocorre por contaminação fecal-oral. O homem pode se infectar pela ingestão de cistos presentes em água e alimentos contaminados, ou pelo contato direto entre pessoas, e ainda pelas más condições de higiene. O ciclo de vida desse protozoário ainda não foi totalmente esclarecido, contudo, nas proposições mais recentes, os autores consideram que o mecanismo de multiplicação de *Blastocystis* spp. ocorre por divisão binária. Os cistos infectam as células do intestino grosso e se multiplicam assexuadamente, sofrem desencistamento com liberação das formas vacuolares, que se diferenciam em formas multivacuolares e ameboides. As formas multivacuolares desenvolvem um pré-cisto e, por esquizogonia, formam os cistos de parede fina, que são responsáveis pela autoinfecção e manutenção da colonização. As formas ameboides, também após um estado de pré-cisto e reprodução esquizogônica, se diferenciam em cistos de parede grossa que são eliminados pelas fezes.

PATOGENIA E ASPECTOS CLÍNICOS

A infecção por *Blastocystis* spp. ainda envolve várias controvérsias em relação à ação patogênica, pois alguns autores consideram que esse protozoário é comensal, e outros acreditam que ele pode causar sintomas inespecíficos, como diarreia, dor abdominal, náuseas, vômitos, anorexia, prurido perianal e flatulência. A diarreia pode ser aguda e autolimitada ou crônica. As observações conflitantes se devem ao fato de que a maioria dos indivíduos acometidos por esse protozoário se apresenta assintomática, e nos casos sintomáticos a remissão dos sintomas muitas vezes ocorre sem que tenha ocorrido tratamento específico. Em adição, alguns estudos descrevem o *Blastocystis* como um patógeno oportunista em pacientes imunocomprometidos, relacionando a patogenia com a imunocomprometidos, virulência da cepa e com a carga parasitária. É importante ressaltar que o *Blastocystis* spp. pode ser encontrado coinfectando os indivíduos com outros micro-organismos patógenos.

Recentes estudos sugerem que a infecção por *Blastocystis* spp. está associada com a síndrome do intestino irritável (SII). É possível que as interações entre o protozoário e o hospedeiro e as condições do ambiente intestinal causada pela SII possam favorecer o desenvolvimento do *Blastocystis*. Entretanto, ainda existe controvérsia entre os estudos, destacando a necessidade de maiores investigações da SII e de subtipos de *Blastocystis* associados a essa doença. Existem vários relatos de casos que sugerem que a infecção por *Blastocystis* está associada com manifestações cutâneas, particularmente a urticária. As formas ameboides de *Blastocystis* ST3 foram encontradas em um caso de urticária aguda. Foi sugerido que a forma ameboide adere eficazmente ao epitélio intestinal, afetando a homeostase imunológica do intestino e causando uma resposta inflamatória contra o parasito.

Os fatores que determinam a patogenicidade e a virulência do *Blastocystis* incluem a carga parasitária, o estado imune do hospedeiro, o genótipo do parasito (subtipo) e o tratamento. Pode-se incluir também o estudo da presença de proteases. O real envolvimento desse protozoário como agente etiológico na patogenia dos distúrbios intestinais deve ser considerado quando se confirma a inexistência de outros agentes patogênicos (vírus, protozoários, bactérias e helmintos). Porém as limitações dos estudos incluem a dificuldade de eliminação de todos os outros agentes patogênicos, o tamanho adequado da amostra e duração do transporte, o número de amostras analisadas, as definições do genótipo ou subtipo de *Blastocystis* e os critérios de relatos se o número de *Blastocystis* por campo em 400× ou 1.000× é maior que cinco formas encontradas. Stenzel e Boreham (1996) estabeleceram a presença de cinco ou mais organismos por campo no aumento de 1.000× como

um indicador de patogenicidade. Os estudos sobre a classificação de *Blastocystis* em vários genótipos, por meio de técnicas moleculares, poderão permitir uma melhor compreensão e conhecimento da patogenia e das variações dos sintomas, além da resposta ao tratamento na blastocistose.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Exame parasitológico de fezes

O *Blastocystis* é identificado no exame microscópico das fezes, utilizando-se os métodos e técnicas parasitológicas de rotina, com ou sem coloração pelo Lugol (Figura 44.25 A, B e C e Figura 44.26.). Os esfregaços permanentes corados pelo tricrômico (Figura 44.27), hematoxilina férrica ou Giemsa são recomendados, pois facilitam a detecção e identificação do *Blastocystis* spp. Recomenda-se o exame de amostras múltiplas, no mínimo três em dias alternados, tendo em vista a eliminação intermitente desse protozoário. Em adição, os métodos de concentração utilizando-se a formalina a 10% e éter ou acetato de etila aumentam a probabilidade de resultados positivos na detecção das formas parasitárias.

Na análise de amostras de fezes frescas, ressalta-se a importância de substituir a água pela solução salina a 0,85% nos procedimentos de diluição e lavagem do sedimento fecal, pois a água pode causar a lise das formas vacuolar, granular e multivacuolar, conduzindo a um resultado falso-negativo. Entretanto, se as fezes forem previamente fixadas e preservadas, as formas parasitárias do *Blastocystis* spp. não serão destruídas. O exame direto de fezes frescas, corado ou não pelo Lugol, pode ser utilizado, porém, por apresentar baixa sensibilidade, poderá dificultar a detecção de pequeno número do parasito na amostra analisada. A presença do *Blastocystis* spp. na amostra fecal deverá ser quantificada em raros (+), poucos (++), moderados (+++) ou muitos (++++) quando o número é > 5 para cada 40 campos microscópicos observados.

- **Cultura**: pode-se obter cultivo em meio bifásico que contém uma fase líquida com solução de Locke e soro de cavalo e fase sólida composta pela coagulação do ovo total. O meio monofásico de Pavlova com sais de fosfato e sódio, amido de arroz e soro de cavalo também é empregado no cultivo. Os tubos são incubados a 36°C por 24h a 72h.

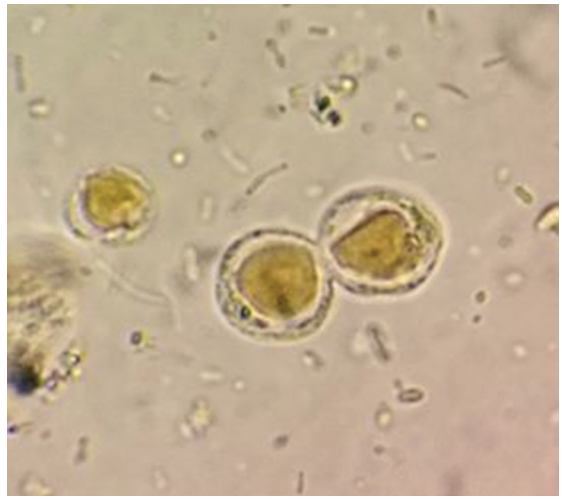


Figura 44.26 Formas vacuolares de *Blastocystis* spp. coradas pelo Lugol. Objetiva de 40×.
Fonte: Cortesia da Profª Drª.Karin Silva Caumo – Laboratório Didático de Parasitologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas da UFSC.

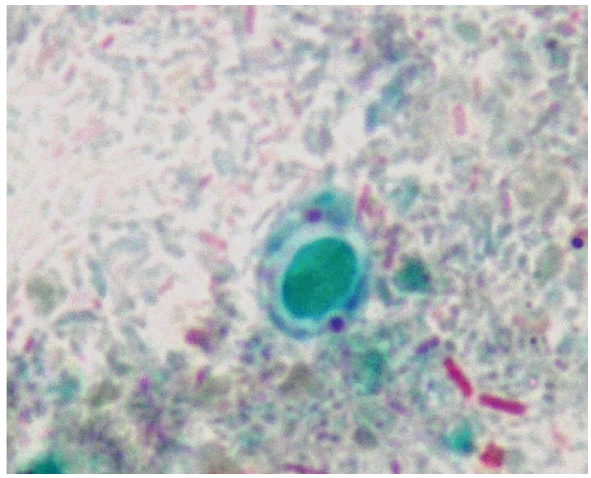


Figura 44.27 Forma vacuolar de *Blastocystis* spp. corada pelo tricrômico. Aumento de 1.000×.
Fonte: Profª Lenilza Mattos Lima (http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br).

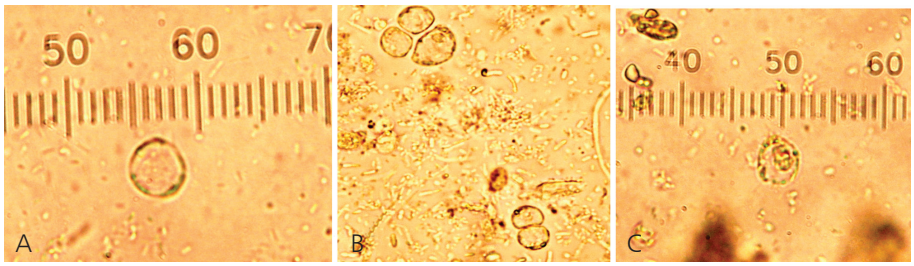


Figura 44.25 (A, B e C) Formas vacuolares de *Blastocystis* spp. coradas pelo Lugol. Objetiva de 40×. Em **A** e **C**: escala ocular: fator de multiplicação 2,5.
Fonte: Profª Lenilza Mattos Lima (http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br).

- **Técnicas moleculares**: Reação em cadeia da polimerase – PCR, padronizada para a detecção de *Blastocystis* spp. nas fezes, permite a identificação de subtipos.
- **Outros métodos e técnicas de diagnóstico**: coloração pela tinta da china, e ensaio imunoenzimático (Elisa) para anticorpos. Os métodos imunológicos não estão disponíveis para uso em laboratórios clínicos, pois ainda estão em desenvolvimento.

Comentários

1. Se forem fezes frescas, as mesmas não devem ser lavadas com água antes do exame de identificação do *Blastocystis* spp.
2. A forma vacuolar é a mais típica e comum nos exames de fezes. Contudo, é importante conhecer e entender a ocorrência do polimorfismo no diagnóstico desse protozoário, principalmente no fato de poder se encontrar outras formas pequenas, como a multivacuolar, e também os cistos.
3. As formas do *Blastocystis* spp. podem ser confundidas com leucócitos ou cistos de *Entamoeba hartmanii*, *Endolimax nana* e *Iodameoba bütschlii*, e ainda o cisto pode ser confundido com leveduras. Ocasionalmente, podem-se encontrar formas em divisão binária.
4. A presença de *Blastocystis* spp. deve ser relatada quando encontrado nos exames de fezes.

Amebas de Vida Livre

Marilise Brittes Rott ▪ Karin Silva Caumo

INTRODUÇÃO

Amebas de vida livre (AVL) são protozoários unicelulares amplamente dispersos no ambiente, capazes de causar infecções em humanos e animais. No grupo das AVL destacam-se diversas espécies do gênero *Acanthamoeba*, o ameboflagelado *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* e *Sappinia pedata*.

Espécies do gênero *Acanthamoeba* e *B. madrillaris* causam infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos ou debilitados, tais como encefalite amebiana granulomatosa, lesões cutâneas, infecções nasofaríngeas, pulmonares e renais. *Acanthamoeba* spp. também causam ceratite amebiana, uma infecção ocular não oportunista, que atinge principalmente usuários de lentes de contato.

Dentre as quarenta e sete espécies descritas para o gênero *Naegleria*, apenas *Naegleria fowleri* causa meningoencefalite aguda hemorrágica e fulminante, levando à morte indivíduos saudáveis com história de contato com água contaminada. *S. pedata*, uma AVL normalmente encontrada em solo contaminado com fezes de alguns animais, também foi identificada como espécie causadora de encefalite.

Acanthamoeba spp.

O gênero *Acanthamoeba* foi criado em 1931 por Volkonski, porém o primeiro indício de que esse organismo poderia causar doença em humanos ocorreu em 1958, quando em cultivos celulares utilizados em ensaios para desenvolvimento de uma vacina para poliomielite apareceram amebas, pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, que após serem inoculadas em modelos animais causaram encefalite. A partir de 1970 foram relatados os primeiros casos de doenças em humanos claramente ocasionados por *Acanthamoeba* spp.

As espécies de *Acanthamoeba* estão entre os protozoários mais frequentes na natureza, pois seus cistos são altamente resistentes a diversas condições adversas, como elevadas temperaturas, pH e também à desinfecção pelo cloro. Estão distribuídas por todo o mundo e já foram isoladas do solo, ar e água, como também de animais e de humanos.

Com base em critérios morfológicos, mais de 24 espécies já foram reconhecidas no gênero *Acanthamoeba*. Essas espécies são classificadas em três grupos (Grupos 1, 2 e 3), de acordo com a morfologia de seus cistos. Entretanto verificou-se que a morfologia dos cistos pode variar com as condições de cultivo, fato que torna inconsistente o uso somente deste parâmetro para classificação especifica. Atualmente, o sequenciamento do 18S rDNA tem sido utilizado para diferenciação de isolados e entendimento da filogenia de *Acanthamoeba* e, até o momento, 20 genótipos já foram identificados (T1 a T20).

Além do seu potencial patogênico, *Acanthamoeba* spp. podem servir como hospedeiros para bactérias patogênicas, tais como *Legionella* spp., e para um grande número de outras bactérias, incluindo *Francisella tularensis*, *Mycobacterium avium*, *Burkholderia* spp., *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Afipia felis* e *Escherichia coli* sorotipo O157.

MORFOLOGIA E CICLO DE VIDA

O ciclo de vida das espécies de *Acanthamoeba* envolve duas formas: uma forma ativa, o trofozoíto e uma forma latente conhecida como cisto (Figura 44.28). O trofozoíto mede entre 14 e 40 μm de diâmetro e se alimenta por fagocitose de bactérias, algas, leveduras, outros protozoários, matéria orgânica ou por inclusão de partículas líquidas. Por meio da emissão de pseudópodes globosos e hialinos, surgem pseudópodes finos, semelhantes a espinhos, chamados de acantopódios, que são estruturas características do gênero, apresentando-se como projeções aciculiformes da membrana celular, importantes na adesão a superfícies (biológicas ou inertes), nos movimentos celulares, bem como na captura de organismos. Reproduz-se através da divisão binária. Em situações adversas, como a falta de alimentos, variações de pH e temperatura e a presença de agentes químicos, os trofozoítos, para sua proteção, encistam-se. O cisto pode variar de 10 a 20 μm de diâmetro e apresenta uma dupla membrana, a exterior, conhecida como ectocisto, e a interior, denominada endocisto (Figura 44.28).

TRANSMISSÃO

As infecções causadas por *Acanthamoeba* spp. acontecem quando trofozoítos ou cistos presentes no ambiente entram em contato com os olhos, com feridas na pele ou através do trato respiratório, resultando no possível estabelecimento e proliferação dos trofozoítos nos tecidos do hospedeiro.

PATOGENIA E ASPECTOS CLÍNICOS

Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) – é a infecção do SNC causada por *Acanthamoeba* spp. É considerada uma infecção oportunista, pois quase todos os casos relatados até o momento se referem a indivíduos imunologicamente debilitados, especialmente aqueles que já sofreram algum tipo de terapia ou situação imunossupressora, como alcoolismo, gravidez, quimioterapia, uso de antibióticos de amplo espectro e pacientes com HIV/AIDS.

Os mecanismos associados com a patologia não estão muito claros, mas as complicações patofisiológicas envolvem o sistema nervoso central (SNC), com indução de uma resposta pró-inflamatória, a partir da invasão pela barreira hematoencefálica e a ligação ao tecido, seguida de lesão neuronal.

A EAG é caracterizada pela formação de granulomas, no entanto, raramente são observados granulomas em indivíduos com imunodeficiência grave. As lesões granulomatosas formadas durante o processo da EAG são compostas de amebas (trofozoítos e cistos), micróglia, macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, linfócitos T e células B. O período de incubação na EAG pode variar de semanas a meses. Os sintomas desta condição desenvolvem-se lentamente ao longo do tempo e incluem dores de cabeça, tontura, rigidez de nuca, náusea e vômitos. Outras áreas do corpo podem ser atingidas pela via hematogênica, incluindo rins, pâncreas, próstata e útero.

Ceratite por *Acanthamoeba* – infecções da córnea causadas por *Acanthamoeba* spp. costumam estar associadas ao uso de lentes de contato, podendo também ocorrer a partir de traumas oculares.

A ceratite amebiana é uma doença progressiva e dolorosa. Clinicamente os sintomas estão ligados à invasão e a degradação dos componentes da córnea, resultando em vermelhidão, lacrimejamento, fotofobia, opacidade e edema nas pálpebras. A dor relatada na ceratite amebiana, provocada por ceratoneurite radial, geralmente é muito intensa e não diretamente relacionada com o quadro clínico visual e ocorre pelo contato de amebas com as células nervosas no estroma da córnea. Inicialmente as amebas são restritas ao epitélio da córnea, com erosões epiteliais puntiformes e tardiamente invadem o estroma, causando dano, opacidade e inflamação, provocados pela presença de neutrófilos, gerando um infiltrado em forma de anel, que é típico da ceratite amebiana. Além da formação do abcesso anelar, poderão ocorrer esclerite, glaucoma, catarata, perfuração da córnea e infecções

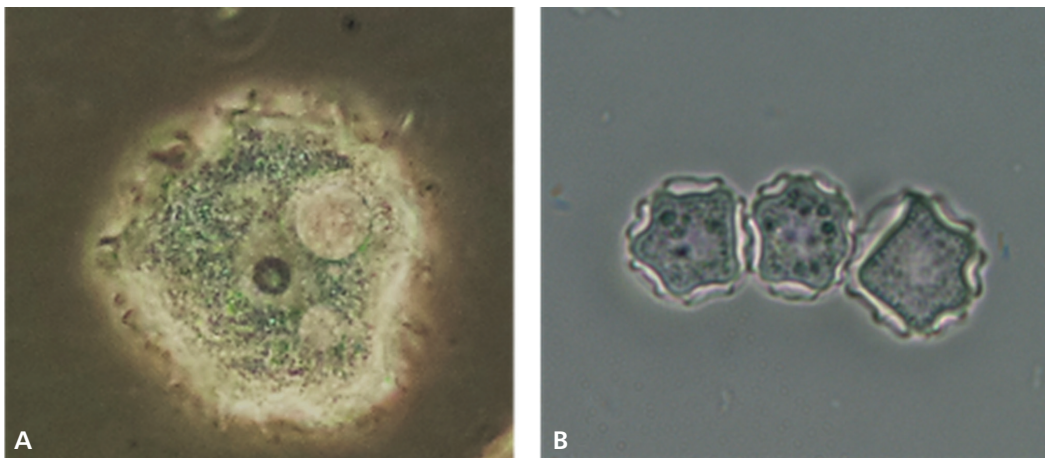


Figura 44.28 *Acanthamoeba* spp. **(A)** Trofozoíto e **(B)** cisto de *Acanthamoeba* spp. por microscopia de contraste de fase.
Fonte: Cortesia da Profª Marilise B. Rott e Karin S. Caumo.

microbianas secundárias. O tecido corneano infectado pode conter cistos e trofozoítos do protozoário.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da ceratite por *Acanthamoeba* spp. é feito por demonstração do cisto em raspado de córnea através de montagem a fresco, ou biópsia e colorações (Giemsa, Wright ou tricrômico), ou ainda por cultivo em placas de ágar não nutriente 1,5% coberto com bactérias, tais como *Escherichia coli* ou *Enterobacter aerogenes* e incubadas a 30 °C, por vários dias (Figura 44.29).

O isolamento de *Acanthamoeba* em cultivo é o método padrão-ouro de diagnóstico, mas outros métodos também têm sido utilizados na identificação, como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), imuno-histoquímica, microscopia confocal *in vivo* e biópsia corneana. O diagnóstico laboratorial de ceratite amebiana em usuários de lentes de contato também pode ser realizado a partir da análise/cultivo de amostras de solução ou biofilme das lentes de contato e de seus estojos.

O diagnóstico da EAG é feito por demonstração de trofozoítos e cistos em biópsia do cérebro, cultivo e imunofluorescência usando anticorpos monoclonais. O liquor apresenta pleocitose linfocítica, níveis de proteínas levemente aumentados e glicose normal ou levemente baixa.

A tomografia do cérebro apresenta resultados inconclusivos.

Balamuthia mandrillaris

A *B. mandrillaris* foi isolada pela primeira vez em 1986, a partir de uma úlcera no cérebro de um babuíno mandril, que morreu de encefalite amebiana granulomatosa (EAG) no zoológico de San Diego, Estados Unidos. Formalmente descrita como uma ameba Leptomixida, encontrada no solo e na poeira, conhecida por ser a única espécie do gênero capaz de causar infecções em humanos e animais, tais como infecções cutâneas e no SNC.

A EAG causada por *B. mandrillaris*, também conhecida como balamutíase apresenta características clínicas similares à infecção causada por *Acanthamoeba* spp., entretanto ela pode infectar indivíduos saudáveis.

A balamutíase é uma doença rara, grave e frequentemente fatal; existem cerca de 200 casos descritos desde o primeiro descoberto em 1986, porém o número de casos pode ser maior em consequência de ser uma infecção rara, somada à dificuldade no diagnóstico. Recentemente foram descritos casos de transmissão ocorridos através de transplantes de órgãos sólidos.

MORFOLOGIA E CICLO DE VIDA

O ciclo de vida de *B. mandrillaris* é semelhante ao do gênero *Acanthamoeba*, apresentando as formas de trofozoíto e cisto. Morfologicamente, os trofozoítos de *B. mandrillaris* são pleomórficos, medindo de 12 a 60 μm. Apresentam prolongamentos citoplasmáticos denominados lobopódios e filopódios, são uninucleados, com nucléolo grande e central. Os cistos de *B. mandrillaris* possuem aproximadamente 12 a 30 μm de diâmetro, são esféricos, uninucleados e, sob a luz microscópica, parecem ter dupla camada, com uma parede externa enrugada e outra interna lisa. Ultraestruturalmente, no entanto, os cistos possuem três paredes: o endocisto, o ectocisto e o mesocisto, caracterizado por uma camada amorfa fibrilar intermediária.

TRANSMISSÃO

Os cistos e trofozoítos de *B. mandrillaris* presentes no solo e no ar podem infectar humanos pelo neuroepitélio olfativo ou rota hematogênica. Pelo neuroepitélio olfativo, após a inalação, o protozoário poderá atravessar a lâmina cribiforme e chegar ao SNC, resultando em disseminação. Na rota hematogênica, as amebas, após infecção por contato com lesões de pele ou cortes, podem se disseminar pela corrente sanguínea, invadindo o SNC via barreira hematoencefálica.

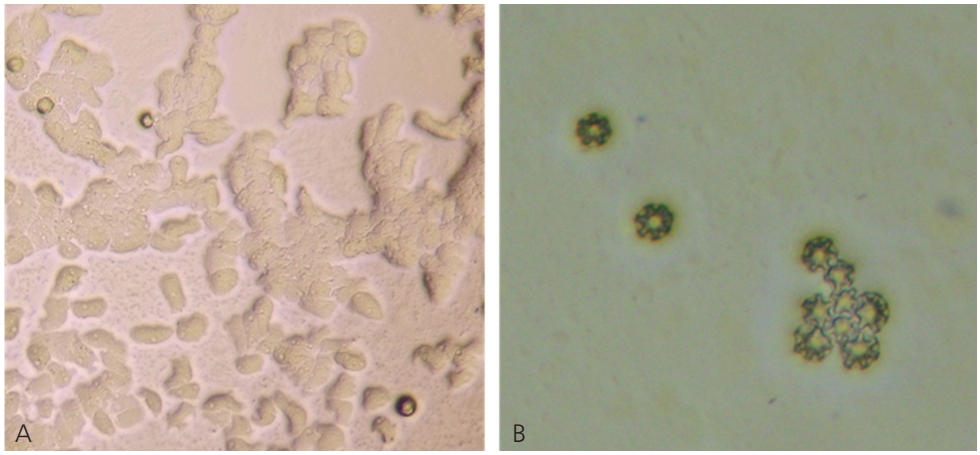


Figura 44.29 **(A)** Trofozoítos e **(B)** cistos de *Acanthamoeba* spp. observados em cultura de um caso de ceratite amebiana.
Fonte: Cortesia Profª Karin S. Caumo.

PATOGENIA E ASPECTOS CLÍNICOS

As características clínicas da EAG causada por *B. mandrillaris* são similares às que ocorrem na encefalite causada por *Acanthamoeba* spp., entretanto a balamutíase pode afetar tanto indivíduos imunocompetentes como imunocomprometidos, particularmente crianças e idosos. Em muitos casos, observa-se a presença de lesões cutâneas e úlceras antes da infecção do SNC. A doença possui uma fase crônica, que pode durar semanas ou meses até o surgimento dos sintomas, tais como febre baixa, dor de cabeça extrema, náusea, vômitos, fotofobia, tonturas, rigidez de nuca, estado de confusão mental, letargia, levando à morte em cerca de 95% dos casos.

No SNC, observam-se edemas e focos hemorrágicos, presença de granulomas no tronco cerebral, hemisférios cerebrais e cerebelo. As áreas de necrose estão repletas de neutrófilos, células mononucleares e células gigantes multinucleadas. Os trofozoítos e cistos são vistos intercalados com infiltrados neutrofílicos e macrófagos.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Os pacientes com balamutíase apresentam sintomas clínicos inespecíficos, por isso a busca pelo agente normalmente é realizada como diagnóstico diferencial, principalmente a partir de dados como o histórico de exposição do paciente, presença de ulcerações na pele e alterações neurológicas. Análises por tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética são eficientes para detectar as lesões no SNC em indivíduos infectados. Na análise do LCR não é possível visualizar trofozoítos, mas pode revelar pleocitose linfocítica, níveis de proteína elevados, níveis normais ou baixos de glicose, além de níveis de pressão normais ou levemente elevados.

Amostras de biópsia cerebral podem apresentar cistos e trofozoítos de *B. mandrillaris*. Pela dificuldade de diferenciação entre *Acanthamoeba* spp. e *B. mandrillaris* por corte e coloração com hematoxilina-eosina, técnicas de imuno-histoquímica são realizadas, utilizando soros com anticorpos de coelho anti-*Acanthamoeba* ou anti-*B. mandrillaris*.

Em casos de lesões na pele (ulcerações), pode-se observar cistos e trofozoítos a partir da biópsia da lesão.

A cultura *in vitro* de *B. mandrillaris* pode ser estabelecida por inoculação de tecido proveniente de lesão cerebral ou pele sobre células de mamífero.

Além da pesquisa de anticorpos anti-*Balamuthia* no soro do paciente, métodos moleculares baseados em PCR têm sido utilizados na detecção de *B. mandrillaris*.

Naegleria fowleri

O protozoário *N. fowleri* é um ameboflagelado termofílico, considerado como o agente etiológico da meningoencefalite amebiana primária (MAP), uma infecção aguda e fulminante do SNC, frequentemente fatal. Das 47 espécies conhecidas, somente a espécie *N. fowleri* é patogênica ao ser humano. Trata-se de uma ameba de vida livre de distribuição mundial, encontrada no solo e na água, principalmente na água aquecida e sem cloração, capaz de tolerar temperaturas entre 40 °C e 45 °C.

Os casos de MAP são raros e, na maioria das vezes, fatais. O primeiro caso humano foi descrito em 1962 por Rodney F. Carter, em um jovem na Austrália com diagnóstico *post mortem*. Desde então, aproximadamente 250 casos já foram relatados, a maioria deles nos Estados Unidos, com apenas três sobreviventes de 133 casos relatados pelo CDC. O número anual de infecções nos Estados Unidos varia de 0 a 8, com maior ocorrência no verão, quando as temperaturas do ar e da água são mais elevadas.

Nos últimos anos, *N. fowleri* tornou-se mais conhecida devido ao aumento de casos altamente complexos, embora o impacto das infecções por esse protozoário seja desconhecido, dado o provável subdiagnóstico nos diferentes países. Do ponto de vista epidemiológico, o risco de adquirir a meningoencefalite por *N. fowleri* cresce proporcionalmente ao aumento da contaminação e temperatura da água. Há maior incidência em crianças e jovens com história recente de natação em lagos e piscinas aquecidas.

MORFOLOGIA E CICLO DE VIDA

Observam-se três estágios no ciclo de vida de *N. fowleri*: as formas de cisto, trofozoíto e flagelada. O trofozoíto é a forma infectante da ameba e a forma encontrada no líquido cefalorraquidiano e tecido cerebral, enquanto as formas flageladas podem ser encontradas ocasionalmente no líquido cefalorraquidiano. Os trofozoítos medem de 10 a 35 μm, com aparência granular, um único núcleo, pseudópodes do tipo lobópode e se reproduzem por divisão binária. Essas formas infectam humanos ou animais, penetrando o tecido nasal e migrando para o cérebro via trato olfatório, através da invasão do microrganismo pela lâmina cribiforme (que é mais porosa em crianças e adultos jovens), resultando em disseminação para o SNC, causando a MAP.

Os trofozoítos se diferenciam em forma flagelada em resposta a estímulos do ambiente. A forma flagelada mede de 10 a 16 μm e tem um núcleo com grande nucléolo, geralmente biflagelada, mas três ou quatro flagelos também podem ser vistos. O flagelado não tem um citóstoma e, portanto, não pode se alimentar.

O trofozoíto transforma-se em cisto resistente sob condições adversas. O cisto geralmente é esférico e liso, mede de 7 a 14 μm e possui dupla parede, com endocisto espesso e ectocisto. Possui um único núcleo e nucléolo proeminente. Os cistos não são encontrados nos tecidos, mas podem ser vistos distribuídos no ambiente e em cultivo.

TRANSMISSÃO

A transmissão ocorre via trato olfatório através da água contaminada com trofozoítos de *N. fowleri*, quando esta é borrifada ou forçada para dentro da cavidade nasal. A maioria dos casos ocorre em crianças e jovens adultos saudáveis durante atividades aquáticas recreativas nos meses quentes do ano, sobretudo em lagos, piscinas, locais contendo água fresca e aquecida.

PATOGENIA E ASPECTOS CLÍNICOS

O conhecimento sobre os fatores de virulência de *N. fowleri* ainda é muito limitado. Observa-se que as lesões são hemorrágicas e necróticas, atingindo inicialmente o lobo frontal e o bulbo olfatório, evoluindo para outras áreas do SNC, incluindo a base do cérebro, o tronco encefálico e o cerebelo. Vários estudos *in vitro* mostram que a ameba, quando inoculada em cultura celular, apresenta efeito citopático capaz de destruir a monocamada.

O período de incubação da MAP varia de 2 a 15 dias. A doença progride rapidamente e os sinais e sintomas de acometimento meningoencefálico incluem febre alta, cefaleia intensa, náuseas, vômitos e rigidez na nuca. Outros sintomas incluem anormalidades no paladar e olfato, congestão nasal, sinal de Kernig, fotofobia, aumento na pressão do líquido cefalorraquidiano (100 – 600 mmHg), convulsões, sinais de desorientação e coma. Normalmente, o paciente evolui a óbito ao final de uma semana a 10 dias, pois a infeccção além de ser rara, progride rapidamente e é muito semelhante aos casos de meningite bacteriana. Dessa forma, geralmente o diagnóstico de MAP é tardio ou *post mortem*.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico é baseado na análise do líquido cefalorraquidiano (LCR), que poderá apresentar aspecto turvo, ou até mesmo hemorrágico, com a presença de eritrócitos e amebas móveis. O LCR apresenta pleocitose, com uma grande quantidade de leucócitos polimorfonucleares, aumento progressivo de eritrócitos, concentrações aumentadas de proteína e baixos níveis de glicose. Bactérias não são visualizadas na bacterioscopia e cultura. A confirmação diagnóstica é obtida pelo encontro de trofozoítos móveis no exame a fresco do sedimento do LCR, corados pelo tricrômico ou Giemsa, e pelo cultivo desse material. Para a visualização de trofozoítos móveis ativamente, o LCR deve ser examinado imediatamente após a coleta por microscopia, preferencialmente de contraste de fase. A ameba apresenta um núcleo com grande nucléolo localizado centralmente, que permite a diferenciação em relação aos leucócitos do hospedeiro.

O cultivo poderá ser utilizado apenas para confirmação da análise do LCR, pois o crescimento da ameba é tardio. Parte do sedimento do LCR ou biópsia do tecido (SNC) poderá ser inoculado para isolamento de *N. fowleri* em cultivo monoxênico, em placas de ágar não nutriente com camada de *Escherichia coli* ou *Enterobacter aerogenes* e incubada a 37 °C, por vários dias. Trofozoítos e cistos poderão ser observados por microscopia na superfície do ágar. Após o isolamento, realiza-se a caracterização, utilizando-se o teste de flagelação. A ameba também poderá ser cultivada axenicamente em meio complexo, com 5% de soro fetal bovino.

A detecção do DNA do parasito por PCR, *nested* PCR ou PCR em tempo real pode ser realizada a partir de amostras não fixadas de tecido cerebral ou de LCR. O diagnóstico molecular é rápido e eficiente, pois a identificação do DNA de *N. fowleri* pode ser realizada no período de 4 a 5 horas do recebimento do espécime clínico, além de ser específico. Ainda, a PCR multiplex permite a identificação das três amebas capazes de causar infecção no SNC (*Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* e *Naegleria fowleri*).

Os trofozoítos de *N. fowleri* também podem ser visualizados por imunofluorescência indireta em amostras de tecido cerebral ou também por avaliação histopatológica obtida por biópsia cerebral estereotáxica e corada pela hematoxilina-eosina (HE).

Sappinia pedata

O gênero *Sappinia* compreende duas espécies distintas *S. pedata* e *Sappinia diploidea*. Esta ameba de vida livre é amplamente distribuída no ambiente e já foi isolada do solo, água fresca, detritos florestais, fezes de mamíferos, alces, bisões, gado e do reto de lagartos.

O ciclo de vida desse organismo apresenta uma fase trófica e uma cística, ambas binucleadas (dois núcleos firmemente unidos). O trofozoíto mede de 40 a 80 μm, é ovoide ou oblongo e parece estar achatado com rugas ocasionais em sua superfície. O citoplasma contém um vacúolo contrátil e vacúolos alimentares. O cisto maduro é redondo e mede de 15 a 30 μm. Ambas as espécies de *Sappinia* (*S. diploidea e S. pedata*) podem ser cultivadas em ágar não nutriente recoberto com bactérias.

Em 2001, Gelman e colaboradores reportaram o primeiro e único caso de encefalite amebiana causada por uma ameba de vida livre, na época identificada como *S. diploidea*, com base na morfologia nuclear da ameba. Recentemente esse caso foi reidentificado como *S. pedata,* com base no sequenciamento molecular. Essa infecção ocorreu em um indivíduo do sexo masculino, de 38 anos, imunocompetente e previamente saudável. O paciente perdeu a consciência em um curto espaço de tempo e apresentou náuseas e vômitos seguidos de dor de cabeça bifrontal, fotofobia e visão borrada que durou 2 a 3 dias. O exame por Ressonância Magnética mostrou uma massa solitária de dois centímetros no lobo temporal posterior esquerdo. A massa excisada no exame microscópico revelou inflamação hemorrágica e necrosante contendo organismos amebianos. O paciente sobreviveu após excisão cirúrgica da lesão necrótica e tratamento por período de em torno de 31 semanas com azitromicina, pentamidina intravenosa, itraconazol e flucitosina.

Trichomonas Vaginalis

Tiana Tasca ▪ Geraldo Attilio De Carli

INTRODUÇÃO

Trichomonas vaginalis é o agente etiológico da tricomoníase, a doença sexualmente transmissível (DST) não viral mais comum no mundo. A incidência da tricomoníase em 2008 foi estimada em aproximadamente 276 milhões de novos casos e uma prevalência de 187 milhões de adultos infectados, entre 15 e 49 anos (WHO, 2012).

TRANSMISSÃO E MORFOLOGIA

Trichomonas vaginalis é transmitido sexualmente e habita o trato geniturinário do homem e da mulher, onde produz infecção. Os parasitos são elipsoides ou ovais e algumas vezes esféricos. Em preparações fixadas e coradas, o corpo é tipicamente elipsoide, piriforme ou oval, medindo, em média, 9,7 µm de comprimento por 7,0 µm de largura. *T. vaginalis* não tem forma cística, somente trofozoítica, a qual apresenta quatro flagelos anteriores e uma membrana ondulante, responsáveis pela motilidade característica encontrada no diagnóstico pela microscopia a fresco. No entanto, muitos autores têm descrito estruturas arredondadas e imóveis, com os flagelos internalizados, como pseudocistos ou formas endoflageladas tanto em amostras clínicas como em meio de cultura.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O parasito *T. vaginalis* tem se destacado como um dos principais patógenos do homem e da mulher e está associado a complicações graves de saúde, pois promove a transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV); é causa de baixo peso de bebês, bem como de nascimento prematuro; predispõe mulheres a doença inflamatória pélvica atípica, câncer cervical e infertilidade. Recentemente, foi demonstrado que a tricomoníase também está associada a tipos de câncer de próstata agressivos. A interação entre *T. vaginalis* com seu hospedeiro é um processo complexo, no qual estão envolvidos componentes associados à superfície celular do parasito e células epiteliais do hospedeiro e também componentes solúveis encontrados nas secreções vaginal e uretral. Assim, o parasito se estabelece através de citoaderência ao epitélio vaginal e causa citotoxicidade.

Na mulher, o espectro clínico da tricomoníase varia da forma assintomática (80% dos casos) ao estado de vaginite aguda. Estudos clínicos determinaram que o período de incubação varia de 3 a 20 dias. A tricomoníase provoca uma vaginite, caracterizada por um corrimento vaginal fluido abundante de cor amarelo-esverdeada, bolhoso, de odor fétido, com mais frequência no período pós-menstrual. O processo infeccioso é acompanhado de prurido ou irritação vulvovaginal de intensidade variável e dores no baixo ventre. O pH vaginal tende a tornar-se alcalino. A mulher apresenta dor e dificuldade para as relações sexuais (dispareunia de introito), desconforto nos genitais externos, dor ao urinar (disúria) e aumento na frequência miccional (poliúria). A vagina e a cérvice podem ser edematosas e eritematosas, com erosão e pontos hemorrágicos na parede cervical, sinal clínico conhecido como *colpitis macularis* ou cérvice com aspecto de morango (2% a 5% dos casos). A tricomoníase é mais sintomática durante a gravidez ou entre mulheres que fazem uso de medicamento anticoncepcional oral.

No homem, em geral, a tricomoníase é assintomática. Em alguns casos, a infecção pode se apresentar como uma uretrite com fluxo leitoso ou purulento e causar uma leve sensação de prurido na uretra. Pela manhã, antes da passagem da urina, pode ser observado um corrimento claro, viscoso e pouco abundante, com desconforto ao urinar (ardência miccional) e, por vezes, hiperemia do meato uretral. Durante o dia, a secreção é escassa. As seguintes complicações são atribuídas a esse organismo: prostatite, balanopostite e cistite. O protozoário pode se localizar ainda na bexiga e na vesícula seminal.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da tricomoníase não pode ter como base somente a apresentação clínica, pois a infecção poderia ser confundida com outras DSTs. A investigação laboratorial é essencial para o diagnóstico da tricomoníase, uma vez que leva ao tratamento apropriado e contribui para o controle da propagação da infecção. Para que os procedimentos de diagnóstico obtenham sucesso, os homens deverão comparecer no laboratório pela manhã, sem terem urinado no dia e sem terem usado medicamento tricomonicida pelo menos 15 dias antes da coleta da amostra. Secreção uretral, sêmen ou urina podem ser utilizados para o exame. As mulheres não deverão realizar a higiene vaginal antes da coleta do material, que inclui secreção vaginal ou urina, e não devem ter feito uso de medicamentos tricomonicidas pelo menos 15 dias antes da coleta da amostra. As duchas vaginais são fortemente desaconselhadas, pois reduzem muito a sensibilidade dos procedimentos laboratoriais. A cavidade vaginal é o local mais fácil de ser infectado e os tricomonas são mais abundantes durante os primeiros dias após a menstruação.

O exame microscópico convencional de preparações a fresco e de esfregaços fixados e corados são procedimentos

laboratoriais empregados no diagnóstico da tricomoníase. Tradicionalmente, o diagnóstico da tricomoníase depende da observação microscópica do protozoário móvel, por meio do exame direto de esfregaços a fresco com auxílio da microscopia de campo claro e/ou de campo escuro e/ou de contraste de fase, bem como pela microscopia de esfregaços fixados e corados. Quando essa pesquisa apresentar resultado negativo, deve ser complementada pelo exame cultural. Nas preparações não coradas são observadas secreções vaginal e uretral diluídas em solução salina isotônica (0,15 M) glicosada (0,2%) e o sedimento urinário. É o exame de rotina usual para a identificação do flagelado. O protozoário perde a sua motilidade característica quando as preparações permanecem em temperatura ambiente por longos períodos; portanto, quando a amostra não for preservada, é imprescindível uma observação microscópica imediata após a coleta. Os métodos de coloração usados no diagnóstico da tricomoníase são: Giemsa, alaranjado de acridina, Leishman, Diff-Quik, Fontana, ácido periódico de Schiff, imunoperoxidase e hematoxilina férrica, segundo Heidenhain (Figura 44.30). No entanto, atualmente não é recomendada a utilização de coloração para o diagnóstico da tricomoníase pelos guias americano e europeu, devido à ocorrência de resultados falso-negativos e falso-positivos.

O diagnóstico através de meios de cultura para a detecção do *T. vaginalis* apresentam alta sensibilidade (95%). Os principais meios de cultura usados são: o de Johnson & Trussell, 1943 (CPLM), o de Kupferberg, Johnson & Sprince, 1948 (STS) e o de Diamond, 1957 (TYM). Outro método de cultura eficaz para o diagnóstico laboratorial da tricomoníase é o denominado InPouch TV™, sensível e específico para o diagnóstico da infecção.

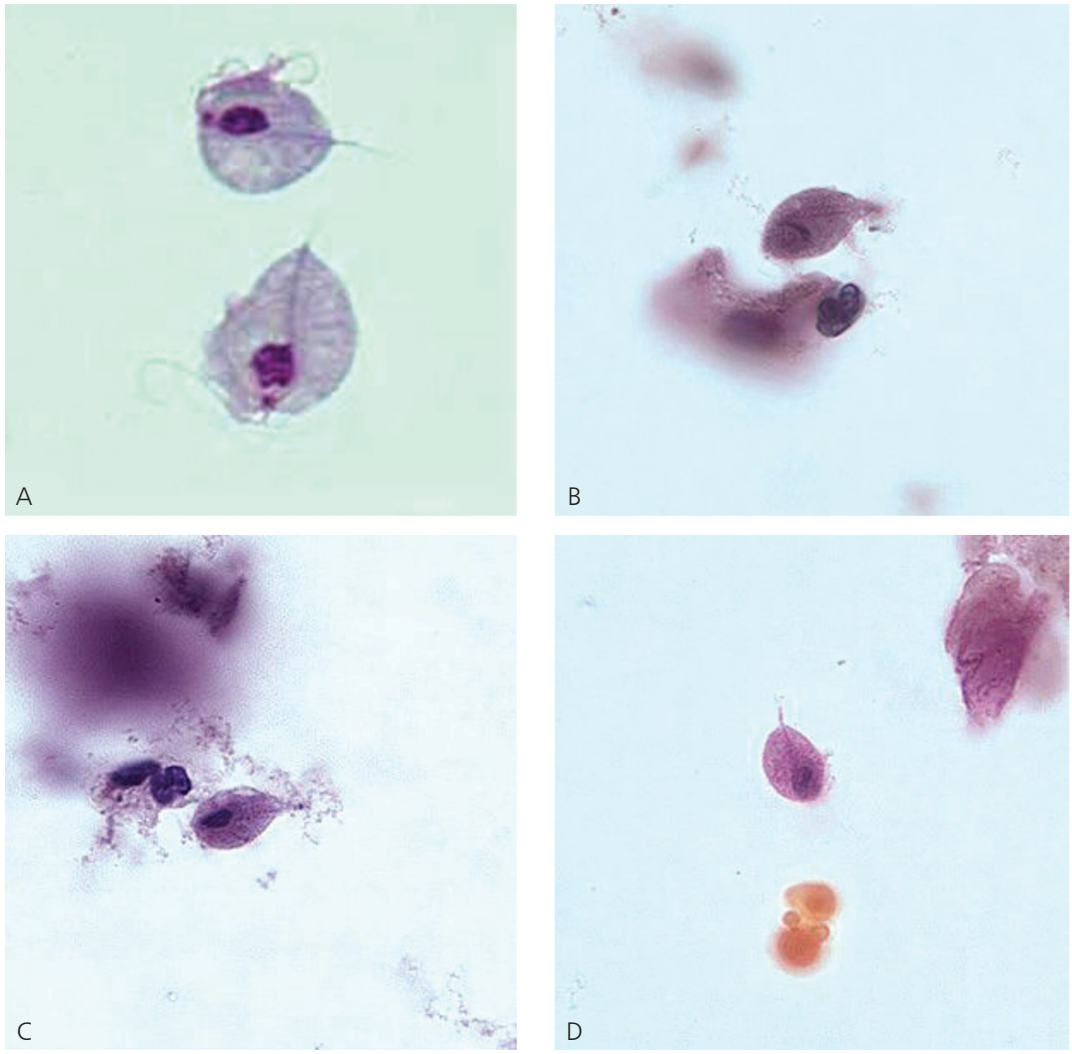


Figura 44.30 Trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* corados pelo Giemsa. **(A)** Dois trofozoítos obtidos de cultura *in vitro*; **(B, C** e **D)** trofozoítos em esfregaço de secreção vaginal.

Fonte: Cortesia de DPDx: CDC website for parasitology identification: http://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/gallery.html#trophs.

O imunodiagnóstico, por meio de reações de aglutinação, métodos de imunofluorescência (direta e indireta) e técnicas imunoenzimáticas (Elisa), tem contribuído para aumentar o índice de certeza do resultado. Essas técnicas não substituem os exames parasitológicos (microscópico e cultura), mas podem completá-los, quando negativos. Os métodos imunológicos têm maior significado nos casos de pacientes assintomáticos, permitindo uma triagem adequada com a possibilidade de um tratamento precoce e uma diminuição do risco da transmissão. Os testes imunológicos não são rotineiramente usados no diagnóstico. Recentemente, foi desenvolvido o teste imunocromatográfico OSOM® (Genzyme Diagnostics, Cambridge, Mass., EUA) para o diagnóstico da tricomoníase, com sensibilidade maior que o exame direto a fresco e resultado fornecido em dez minutos.

Métodos moleculares, como testes de amplificação de ácidos nucleicos, permitem a identificação segura da tricomoníase e são atualmente considerados o padrão ouro no diagnóstico laboratorial. Esses testes apresentam elevada sensibilidade e especificidade (76% a 100%) e aumentam significativamente a detecção desta DST principalmente em mulheres.

PREVENÇÃO E TRATAMENTO

Considerando que o mecanismo de transmissão da tricomoníase é a relação sexual, o controle da mesma é constituído das mesmas medidas preventivas que são tomadas no combate às outras DSTs, como uso de preservativos. O tratamento da tricomoníase é limitado, com apenas dois fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administrarion* (FDA, EUA), o metronidazol e o tinidazol, ambos pertencentes à classe dos 5-nitroimidazois. Apesar de o metronidazol ser o fármaco de escolha na terapêutica, diversos efeitos colaterais são associados à sua utilização. Além disso, estudos apontam a emergente resistência ao metronidazol em cerca de 10% dos isolados. Em gestantes, esses medicamentos não devem ser usados via oral, somente pela aplicação local de cremes, geleias ou óvulos. Há vários esquemas propostos de tratamento. O mais aplicado é aquele que utiliza dose única, sendo metronidazol 2 g via oral para homens e mulheres. O metronidazol pode ser utilizado na dose de 500 mg duas vezes ao dia por sete dias.

Leishmania spp.

Marcos E. de Almeida ▪ Catieli Gobetti Lindholz

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por pelo menos 20 espécies de parasitos do gênero Leishmania e subgênero Viannia, que são pertencentes à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, filo Protozoa. O perfil morfológico desses parasitos revela duas formas evolutivas distintas: 1) a forma promastigota (flagelada, extracelular), encontrada nos vetores, a qual, em meios de cultura, apresenta formato alongado, medindo entre 15 a 40/1,5 a 3,0 μm, núcleo esférico, geralmente centralizado e cinetoplasto na região anterior; e 2) a forma amastigota (aflagelada), sendo esta apresentação do parasito intracelular obrigatória, encontrada nos hospedeiros vertebrados, apresentando formato esférico ou ovoide, cujo tamanho varia entre 1,5 a 5,5 μM. Essas formas apresentam núcleo esférico, um cinetoplasto em forma de bastão e flagelo interno. O tamanho dos parasitos nessas formas varia de acordo com a espécie. Uma característica dos tripanossomatídeos é a estrutura do DNA mitocondrial (kDNA) na forma de mini e maxicírculos, que são encontrados no cinetoplasto em milhares de cópias. Os principais vetores responsáveis pela transmissão da doença são as fêmeas de flebotomíneos, pequenos dípteros pertencentes aos gêneros Phlebotomus e Lutzomyia. Estes insetos apresentam hábito noturno e, no Brasil, são popularmente conhecidos como "asa branca", "asa dura", "berebere", "birigui", "cangalinha", "mosquito palha", "maruíno" e "tatuquira". Embora os flebotomíneos sejam os vetores conhecidos por propagar as leishmanioses, recentemente a presença de *Leishmania infantum* e *L. chagasi* foi detectada em pulgas e carrapatos coletados em cães portadores da infecção (Colombo e col., 2011).

A infecção dos hospedeiros vertebrados ocorre no momento do repasto sanguíneo dos flebotomíneos. Ao picar um hospedeiro suscetível, os parasitos são regurgitados pelas fêmeas na forma promastigota. Estas formas são fagocitadas pelos macrófagos, onde sofrem transformação para formas amastigotas e se multiplicam por divisão binária. Ao serem rompidos, os macrófagos liberam os parasitos na corrente sanguínea e/ou linfática, desencadeando reação inflamatória, e, consequentemente, infectando outras células do sistema imune e dando continuidade ao ciclo no hospedeiro. Quando sugadas pelo vetor durante outro repasto sanguíneo, as

amastigotas sofrem transformação para formas promastigotas, que continuam sua multiplicação, até serem novamente inoculadas em outros hospedeiros.

As espécies comumente associadas à leishmaniose humana pertencem ao complexo donovani (L. donovani, L. chagasi), encontradas em praticamente todas as regiões endêmicas para leishmaniose visceral. Espécies pertencentes ao subgênero Viannia (principalmente *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviania*) e as do complexo mexicana (*L. mexicana* e *L. amazonensis*) encontram-se amplamente distribuídas pelas Américas, em especial nas áreas endêmicas de leishmaniose mucocutânea. Além dessas espécies, *Leishmania major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* são encontradas em áreas endêmicas de leishmanioses no velho mundo.

A leishmaniose pode se manifestar através de diferentes quadros clínicos, dependendo da espécie causadora da doença. A forma clínica mais agressiva é a leishmaniose visceral (LV), causada pelas espécies do complexo donovani, que, na ausência do tratamento, pode causar a morte do paciente. As várias manifestações da leishmaniose cutânea (LC) (leishmaniose tegumentar americana – LTA, como também são conhecidas nas Américas Central e do Sul) são, na maioria dos casos, manifestações que se curam naturalmente, sem a necessidade de tratamento. Entretanto, a cura natural pode demorar anos e deixar marcas e cicatrizes. Além disso, nas Américas Central e do Sul, as lesões cutâneas causadas por espécies do subgênero Viannia podem se espalhar e causar lesões nas membranas mucosas da boca, garganta e nariz – promovendo, assim, o quadro característico da leishmaniose muco-cutânea – LMC. Embora existam medicamentos menos agressivos, as drogas tradicionalmente utilizadas no tratamento da doença são compostos a base de antimônio pentavalente (Sb^V), podendo levar o paciente a apresentar variados efeitos colaterais. A eficiência do tratamento depende do estado imunológico do paciente e da espécie de *Leishmania* responsável pela infecção. Por esses motivos, o diagnóstico deve ser feito de maneira precisa e anterior ao início do tratamento. Além disso, a escolha do tratamento deve ser individualizada, de acordo com as particularidades de cada caso.

As leishmanioses são endêmicas em 88 países distribuídos em zonas tropicais e no sul da Europa (Martins e col., 1978; Galati, 2000, WHO, 2015) e apresentam estimativas de 500 mil novos casos de LV (MS, 2011) e cerca 1,5 milhões de casos de LC ao ano, sendo consideradas entre as doenças infecto-parasitárias de maior incidência mundial. No Brasil, a infecção é documentada desde 1855, porém os registros cresceram abruptamente a partir de 1908, com a construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil (São Paulo), quando numerosos casos foram notificados, em especial em Bauru, tornando-se conhecida como "úlcera-de-Bauru". Inicialmente, as infecções por *Leishmania* spp. eram consideradas de ocorrência predominantemente rural, porém recentemente tem-se observado a sua expansão às áreas urbanas de médio e grande porte. A rápida expansão e adaptação do protozoário e seus vetores a essas áreas têm sido evidenciadas pelo aumento dos casos diagnosticados em todos os estados, incluindo algumas mortes associadas a LV (MS, 2013). Dados do Ministério da Saúde apontam que o número de notificações, em 20 anos, somou 48.455 casos. As espécies de maior importância epidêmica no Brasil são *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infatum/chagasi* (Schriefer e col. 2005).

Como não há vacinas ou drogas que previnam a doença, a melhor forma de prevenir a infecção é minimizar as picadas dos flebotomíneos. Sempre que possível, deve-se evitar atividades noturnas nas áreas endêmicas, utilizar roupas longas e repelentes nas partes expostas da pele. O controle de vetores pelo uso de inseticidas e a vigilância de animais que servem de hospedeiros para o parasito são práticas eficientes na prevenção da doença em certas regiões. Além disso, o diagnóstico precoce e o tratamento apropriado são práticas importantes para se evitar a transmissão antroponímica (humano-vetor-humano) da doença.

PATOGENIA E ASPECTOS CLÍNICOS

Leishmaniose cutânea (Leishmaniose Tegumentar Americana – LTA)

A LC apresenta lesões ulceradas indolores, por vezes crostosas ou com fundo granuloso e avermelhado. Normalmente apresenta úlcera única, com forma arredondada ou ovoide de tamanho de alguns milímetros, podendo atingir alguns centímetros. As lesões caracterizam-se por bordas bem delimitadas, elevadas e eritematosas, por vezes com exsudato amarelado presente. Normalmente a sua manifestação ocorre dentro de algumas semanas ou meses após a exposição ao vetor, mas ocasionalmente a primeira manifestação pode demorar anos, como resultado de um trauma ou um quadro de imunossupressão, por exemplo. Em geral, essas lesões não cicatrizam e persistem por meses ou anos, podendo permanecer abertas por longos períodos, o que facilita a ocorrência de infecções secundárias, como as bacterianas, ou o aparecimento de miíases. Nas Américas, esta manifestação clínica é causada pelas espécies do complexo mexicana e subgênero Viannia. Em outras regiões endêmicas são causadas principalmente pelas espécies *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*. As espécies do complexo donovani, embora estejam associadas à leishmaniose visceral, também podem causar lesões cutâneas. A LC é normalmente uma infecção autolimitada que apresenta cura espontânea após alguns meses de infecção. Entretanto, após um determinado tempo de cura, sendo esta com ou sem administração medicamentosa, pode haver o reaparecimento disseminado das lesões caracterizado em dois tipos: 1) leishmaniose cutânea difusa (LCD), caracterizada por lesões crostosas, pardo-enegrecidas de aspecto nodular, localizadas em várias partes do corpo; 2) leishmaniose muco-cutânea (LMC), em que as lesões destrutivas e desfigurantes podem atingir regiões da faringe, palato, lábios, língua, laringe e, excepcionalmente, traqueia e árvore respiratória superior, podendo ser fatal pelo acometimento secundário do sistema respiratório. São, por isso, lesões metastáticas recorrentes de lesões primárias provocadas principalmente pela *L. braziliensis* e também *L. panamensis* e, em alguns casos, pela L. guyanensis

e, mais raramente, pela *L. amazonensis*. A magnitude e fatores determinantes do parasito e do hospedeiro no risco do desenvolvimento da LMC são muito pouco conhecidos; considerando uma mesma espécie (por exemplo, *L. braziliensis*), o risco de desenvolver a doença varia entre as regiões geográficas. O diagnóstico ao nível de espécie e o conhecimento do histórico de viagem do paciente são fatores fundamentais para a determinação da estratégia de tratamento. O tratamento adequado da LC é a forma mais eficiente de reduzir o risco da LMC.

Leishmaniose visceral

O termo leishmaniose visceral (LV) engloba um amplo espectro de manifestações crônicas da infecção, subagudas e agudas. Trata-se de uma infecção assintomática que pode se manifestar clinicamente após anos ou décadas da exposição do paciente ao vetor ou em pacientes que se tornaram imunossuprimidos por outras razões médicas (HIV/AIDS, por exemplo). Embora as espécies do complexo donovani (*L. donovani* e *L. donovani infantum/chagasi*) sejam reportadas como as responsáveis pela LV, existem relatos raros indicando a presença de *L. amazonensis* e *L. tropica* em alguns casos de LV. Essa manifestação clínica se caracteriza por afetar órgãos internos, como fígado, baço e medula óssea, sendo que os primeiros sintomas são geralmente subagudos, com progressão lenta de mal-estar, febre, perda de peso e esplenomegalia (com ou sem hepatomegalia), podendo o paciente apresentar dor à apalpação do baço e desconforto abdominal no quadrante superior esquerdo. Pode haver quadro de anemia profunda em decorrência de altas cargas parasitárias, causando hemólise, além do acúmulo de amastigotas no baço, fígado e medula óssea, consequentemente causando danos ao sistema de eritropoese. Nas formas avançadas, a doença pode promover disfunção hepática e deficiência na produção de albumina e consequente ascite abdominal e icterícia. Podem ocorrer também complicações hemorrágicas devido à trombocitopenia e disfunção hepática grave, sangramento espontâneo da gengiva, mucosa nasal ou outros locais. A forma clínica da leishmaniose visceral é vista como uma das manifestações de maior gravidade, pois, quando não tratada adequadamente, determina altos níveis de letalidade. A doença também é conhecida como kala-azar ("febre negra"), termo reservado para os casos mais graves (avançados) e refere-se ao escurecimento da pele, sendo este um sintoma comum no sul da Ásia, mas não nas demais regiões geográficas. Alguns pacientes, predominantemente no sul da Ásia e leste da África, desenvolvem a leishmaniose pós kala-azar, uma síndrome que se caracteriza pelo aparecimento de lesões na pele, na maioria das vezes no rosto, em intervalos variados depois ou durante o tratamento da LV.

TRATAMENTO

Em geral, todos os casos de leishmaniose visceral ou leishmaniose mucocutânea devem ser tratados, ao passo que nem todos os casos de leishmaniose cutânea requerem tratamento. Devido ao grau de complexidade, os casos de leishmaniose devem ser tratados individualmente por um médico especialista neste tipo de infecção. Crianças, idosos, mulheres grávidas ou lactantes, pacientes imunossuprimidos ou que apresentam outros quadros clínicos podem precisar de terapias alternativas. A eficiência do tratamento depende dos fatores imunológico e biológico do paciente, bem como da espécie e cepa do agente da infecção. A combinação desses fatores, associada à região de ocorrência da infecção, pode estar diretamente relacionada à eficiência da estratégia de tratamento. Nesse sentido, dados obtidos em pesquisas clínicas realizadas na Índia indicam que as abordagens terapêuticas (bem como a sua eficiência) utilizadas no tratamento da LV naquele país não se aplicam, necessariamente, a outras regiões geográficas ou no tratamento das demais formas clínicas da leishmaniose.

Tradicionalmente, as drogas usadas no tratamento da doença são compostos que apresentam em sua fórmula o metal pesado antimônio (antimônio pentavalente – Sb^{V}), sendo, assim, consideradas drogas agressivas, podendo provocar diversos efeitos colaterais. Outros agentes parenterais (como a Anfotericina B Lipossomal) usados no tratamento da LV podem causar problemas renais, tonturas, tremores, náuseas, taquicardia, febre e calafrios. Em 2014, a agência reguladora dos Estados Unidos Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso da Miltefosina, um agente oral para o tratamento da doença. Entretanto, essa droga não é recomendada para gestantes ou mulheres que pretendem engravidar em cerca de cinco meses após o término do tratamento. Medicamentos antifúngicos que embora não tenham sido oficialmente aprovados pelo FDA para o tratamento da leishmaniose (cetoconazol, itraconazol, fluconazol) também são usados com sucesso em alguns casos da doença. Alguns casos de LC que não apresentam risco de disseminação para as mucosas podem ser tratados com terapias locais como a crioterapia ou termoterapia.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Apesar dos avanços nas descobertas científicas, as leishmanioses seguem constituindo um importante problema de saúde pública mundial. Atualmente, o diagnóstico para as manifestações mais comuns (visceral, cutânea ou mucocutânea) se dá por meio da associação entre análises clínicas, epidemiológicas e laboratoriais. Sendo assim, a análise laboratorial é muito importante na correta elaboração do diagnóstico, uma vez que os resultados permitem a identificação das espécies.

As leishmanioses, por serem consideradas doenças de notificação compulsória aos órgãos de saúde competentes e apresentarem características clínicas de evolução grave, em especial nos casos de leishmaniose visceral, devem ter seus diagnósticos precisamente realizados, e o mais precocemente possível. Dessa forma, as rotinas de diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos pacientes devem, obrigatoriamente, ser implantadas em todas as regiões de transmissão do para-

sito, ou em zonas com risco de transmissão (Ministério da Saúde, 2014).

De acordo com as diretrizes determinadas pelo Sistema Único de Saúde, alguns níveis de complexidade são estabelecidos no atendimento de casos suspeitos de leishmaniose, distribuídos da seguinte maneira:

- **Atendimento primário:** casos suspeitos são encaminhados aos postos de saúde, onde ocorre a notificação. Estas unidades também assumem a responsabilidade de apoiar os serviços das ações de vigilância epidemiológica, disponibilização do tratamento, observação de possíveis reações adversas na aplicação do medicamento, bem como encaminhar os pacientes à avaliação médica. Também cabe aos postos de saúde realizar buscas de pacientes ausentes ao tratamento e acompanhamento dos indivíduos após o tratamento;
- **Atendimento secundário:** os atendimentos são realizados em centros de saúde e, da mesma forma que no atendimento primário, nesta instância os casos de leishmaniose são investigados e notificados aos sistemas de saúde. Nos centros de saúde é realizado o diagnóstico clínico e laboratorial, onde a amostragem de material é realizada para exames sorológicos, parasitológicos e, quando possível, para exames complementares. Nos casos onde a estrutura física é precária ou inexistente, os exames devem ser encaminhados a laboratórios de referência. Após confirmação de infecção, o tratamento é realizado, seguido de acompanhamento clínico durante e após o término deste. Em situações de difícil diagnóstico, falha terapêutica ou em casos de reações adversas graves, os pacientes são encaminhados a hospitais de referência.
- **Atendimento terciário:** esse atendimento é realizado em hospitais gerais e/ou de referência e, como nos casos anteriores, também realiza a notificação dos casos suspeitos e faz o diagnóstico clínico e laboratorial. Os hospitais também fornecem apoio aos serviços de vigilância epidemiológica, realizam exames laboratoriais complementares e disponibilizam tratamento padrão e, quando necessários, tratamentos alternativos. Além do tratamento clássico desenvolvido de maneira semelhante ao atendimento primário e secundário, os hospitais também podem realizar o isolamento e caracterização das cepas de *Leishmania* spp., ou encaminhar tais amostras aos laboratórios de referência. Também compete aos hospitais apoiar as Secretarias Estaduais ou Municipais de Saúde nas capacitações de recursos humanos quanto às técnicas de diagnóstico e tratamento das leishmanioses.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL CLÁSSICOS

Vários métodos podem ser usados no diagnóstico da leishmaniose, ou seja, detectar o parasito na amostra e identificar a sua espécie. Alguns métodos estão disponíveis somente em laboratórios de referência ou de grande porte, fato que dificulta o diagnóstico ao nível das espécies em alguns casos. A identificação da espécie é importante, principalmente nos casos relacionados às regiões onde circulam mais de uma espécie da *Leishmania*, e quando, como no caso do Brasil, essas espécies estão associadas a diferentes quadros clínicos e podem ter implicações no prognóstico da doença. O diagnóstico laboratorial da leishmaniose pode ser feito a partir de vários tipos de amostras, incluindo biópsias das lesões cutâneas, medula óssea, nódulos linfáticos, aspirados de diferentes órgãos e sangue periférico. Atualmente os métodos tradicionais de detecção e identificação do parasito têm suas aplicações questionáveis em alguns casos, devido, principalmente, ao avanço das técnicas moleculares, que são mais sensíveis e específicas. Métodos bastante utilizados como a microscopia, cultura e grande parte dos testes sorológicos não possuem sensibilidade para discriminar os parasitos ao nível das espécies. Assim, é muito importante ter o conhecimento das vantagens e limitações de cada técnica empregada no diagnóstico da doença. Os métodos laboratoriais utilizados com mais frequência no diagnóstico das diversas formas de leishmaniose estão descritos abaixo.

- **Microscopia:** Esse procedimento é baseado na utilização de amostras de tecidos ou fluidos corpóreos. Em geral, a microscopia utilizada nas análises de lâminas preparadas a partir de tecido fresco (touch-prep) apresenta baixa sensibilidade em relação às análises dos tecidos seccionados e fixados nas lâminas (H&E). Independente da forma como a lâmina foi preparada (usando tecido fresco ou seccionado), esse procedimento não permite a identificação da espécie do parasito. Colorações pelo método de Giemsa apresentam sensibilidade estimada entre 60% e 85% quando utilizado fluido da medula espinhal. Em casos de aspirados esplênicos, estima-se que a sensibilidade seja superior, atingindo 93%. Esfregaços realizados com amostras de sangue periférico ou medula óssea apresentam baixa sensibilidade, em especial em indivíduos com baixas cargas parasitárias, favorecendo, assim, a ocorrência de resultados falso-negativos. Somado a esses fatores, é de suma importância a qualidade das lâminas preparadas e a capacitação técnica para leitura dos resultados. O esfregaço por aposição (imprint) é realizado por meio da compressão repetida do fragmento de tecido sobre uma lâmina previamente desengordurada, deixando-se secar à temperatura ambiente. Após, o esfregaço é fixado por três minutos com metanol e corado pelo método de Giemsa. A pesquisa de formas amastigotas é feita com aumento de 1.000× (Figura 44.31).
- **Cultura seguida pela análise enzimática (MLEE – *Multilocus Enzyme Electrophoresis*):** A cultura de parasitos seguida pela análise enzimática (MLEE – Multilocus Enzyme Electrophoresis) ainda é considerada por muitos pesquisadores como o método padrão para identificação das espécies de *Leishmania*. Embora bastante eficiente na identificação dos parasitos, essa metodo-

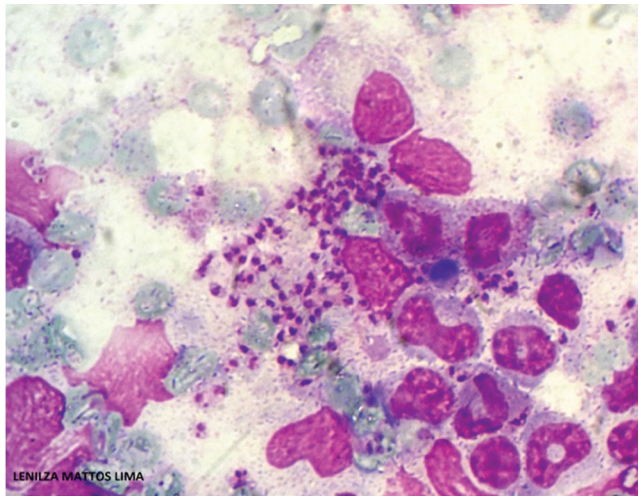


Figura 44.31 *Leishmania* spp. Esfregaço por aposição (imprint) com formas amastigotas coradas pelo Giemsa. Aumento de 1.000×.
Fonte: (Cortesia da Profª Lenilza Mattos Lima).

logia é muito trabalhosa, podendo demorar semanas ou meses para que se obtenha a massa de parasitos necessária para o procedimento do teste e concluir o diagnóstico. Além disso, a cultura é um procedimento que sofre muitas interferências do ambiente onde os parasitos são cultivados, seja pelas condições em que as amostras foram coletadas e/ou preservadas ou por contaminação de outros agentes biológicos ou componentes do meio de cultura. Além disso, nem todas as espécies de *Leishmania* se desenvolvem na mesma proporção em determinado meio de cultura.

- **Testes sorológicos:** São baseados na presença de resposta humoral específica, sendo amplamente utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral. O diagnóstico sorológico tem sido amplamente utilizado porque os títulos de anticorpos contra *Leishmania* são altos durante a fase aguda da doença. Apesar de apresentarem níveis de sensibilidade e especificidade relativamente altos, os testes sorológicos podem resultar em diagnósticos falso-positivos, uma vez que os anticorpos permanecem circulantes no indivíduo durante longo tempo após a cura da infecção, não apresentando, assim, diferenciação entre infecção atual e passada. Entre os testes mais utilizados, estão:
  - **rK39 (Kalazar Detect™ Test for Visceral Leishmaniasis):** É um método imunocromatográfico rápido (*dip-stick*) utilizado para o diagnóstico de LV por meio da detecção específica de anticorpos contra os membros do complexo donovani no soro humano. Por ser um teste específico, o rK39 tem a vantagem de não ter reações cruzadas como outros testes (Elisa, IFA ou DAT). A região de teste do "dip-stick" é carregada com antígeno recombinante da LV e, mais acima, outro antígeno impregnado na membrana serve de controle interno do teste. Durante o teste, as amostras de soro reagem com um conjugado marcado (que também foi carregado no dispositivo) e, por capilaridade, essa mistura se desloca para a parte superior do *stick*. Se a amostra for positiva, a mistura reage com o antígeno recombinante gerando uma linha vermelha na região de teste e, caso a amostra seja negativa nenhum sinal é verificado nessa região. Mais acima, independentemente de a amostra ser positiva ou não, outra linha vermelha será gerada na região de controle, indicando que o volume de amostra utilizado foi adequado e que não houve problemas no funcionamento do teste. Em resumo, a presença de duas linhas vermelhas indica que a amostra é positiva e a presença de uma linha indica que a amostra é negativa.

Uma das alternativas no diagnóstico da leishmaniose visceral é o teste de imunofluorescência indireta (RIFI), utilizado desde a década de 1960, que detecta anticorpos circulantes. Apresenta alta sensibilidade (taxas variadas entre 87% e 100%) e especificidade entre 77% e 100% (Boelaert e col., 2004). No Brasil, é um dos exames utilizados para o diagnóstico pela rede de laboratórios do SUS (Ministério da Saúde, 2006). No caso de utilização desse teste, formas promastigotas do parasito devem ser utilizadas na produção dos antígenos, a fim de minimizar a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com outros protozoários, em especial tripanossomatídeos. A resposta dos anticorpos, neste caso, pode ser detectada em casos de infecção recente, tornando-se negativa após um período de cerca de nove meses após a cura. Laboratórios equipados com microscópios de fluorescência podem ser utilizados como centros de referência no uso desse teste.

O teste de aglutinação direta (DAT) utiliza aglutinação de promastigotas que reagem especificamente com anticorpos para *Leishmania* em amostras de soro dos pacientes infectados. Tal reação resulta na aglutinação das células, que, quando coradas com corante de Coomassie e armazenadas em tripsina, formam uma suspensão celular, que pode ser armazenada à temperatura ambiente e utilizada por longos períodos, o que viabiliza a utilização do teste em abordagens de campo (Fakhar e col., 2012). Em estudo comparativo entre metodologias diagnósticas para leishmaniose visceral, o teste de aglutinação direta apresentou níveis de sensibilidade estimados em 94,8% e especificidade de 97% (Chappuis e col., 2006). Esse teste apresenta razoável simplicidade na execução quando comparado às demais metodologias, entretanto apresenta fortes contrapontos quanto à sua reprodutibilidade, altamente dependente da elaboração do antígeno. Sendo assim, essa metodologia pode ser utilizada como teste diagnóstico em áreas endêmicas, em casos em que a confirmação parasitológica se faz inviável, de maneira que o resultado do teste deve ser correlacionado à sintomatologia clássica da infecção. Uma alternativa à utilização desse teste é o método *EasyDay*, cujas sensibilidade e especificidade correspondem ao método clássico, entretanto apresenta vantagens na simplificação de padronização e redução de custos (Gómez-Ochoa e col., 2003).

- **Elisa (Enzyme-linked Immunosorbent Assay):** Essa técnica apresenta alta sensibilidade, e sua especificidade é dependente do antígeno de escolha. Uma opção amplamente utilizada é o antígeno bruto solúvel de promastigotas, obtido por meio da oscilação de temperaturas em ciclos de congelamento e descongelamento de células vivas do parasito. Esse antígeno, quando utilizado, faz com que o teste apresente sensibilidade entre 80% e 100%, com especificidade entre 84% a 95% (Ryan e col., 2002). Estudos demonstraram que, quando a seleção de determinadas moléculas antigênicas, como as de pesos moleculares de 66 kDa, 72 kDa e 116 kDa, foi utilizada, a sensibilidade do teste foi de aproximadamente 100%, entretanto seu nível de especificidade foi muito inferior, não ultrapassando a margem de 40% (Maurya e col., 2010).

Em adição a isso, diversas porções proteicas têm sido alvo de testes na detecção de infecção por diferentes espécies de *Leishmania* causadoras de lesão visceral; entre estas, podemos citar as proteínas de choque térmico, histonas e proteínas de ligação de lipídeos. Esses antígenos têm apresentado altos níveis de sensibilidade e parecem não apresentar reatividade cruzada com soros de pacientes positivos para demais infecções (Elmahallawy e col., 2014).

- **Western Blot:** É uma técnica realizada por meio do cultivo de células promastigotas, que, após sua lise, têm suas porções proteicas separadas em SDS-PAGE. Essas proteínas, após separação, são transferidas à membrana de nitrocelulose e "sondadas" com amostra de soro do paciente. Esse método é útil em casos de investigação de infecção, uma vez que fornece respostas detalhadas de anticorpos a inúmeros antígenos de *Leishmania* (Ravindran e col., 2004). O teste também tem se mostrado mais sensível quando comparado com testes de IFA e Elisa (Cota e col., 2012).
- **Técnicas moleculares:** Nas últimas duas décadas, as técnicas moleculares promoveram um avanço fundamental no diagnóstico da leishmaniose e, por apresentarem vantagens, como serem menos trabalhosas, mais rápidas, mais sensíveis e específicas, em alguns laboratórios estão substituindo as técnicas tradicionais pelas moleculares. As técnicas moleculares baseadas na amplificação de segmentos específicos do DNA do parasito por PCR são as principais técnicas utilizadas na identificação das espécies e das cepas. A determinação da espécie é, muitas vezes, importante na definição das estratégias de tratamento e no acompanhamento da progressão da doença. O DNA do cinetoplasto (kDNA) é o alvo de amplificação preferido de muitos investigadores, por apresentarem um elevado número de cópias em cada organismo. Assim, os protocolos que utilizam esses alvos são considerados os mais sensíveis para o diagnóstico genérico do parasito. Entretanto, devido ao elevado nível de variações presentes dos minicírculos, a especificidade desses testes é muitas vezes baixa. Alvos de múltiplas cópias no DNA genômico, como, por exemplo, o gene do RNA ribossomal (rRNA) são usados como alternativa para aumentar a especificidade dos testes moleculares. Uma vez que o rRNA apresenta um número de cópias muito inferior em relação ao kDNA, os protocolos baseados na sua amplificação são, em geral, menos sensíveis do que os protocolos que utilizam o kDNA (Bensoussan e col., 2006). Entretanto, os benefícios da relação entre sensibilidade e especificidade torna o rRNA um alvo muito mais atrativo no diagnóstico específico da leishmaniose. De Almeida e col. descreveram, em 2010, um protocolo baseado na amplificação de um segmento da região do ITS2 (uma das regiões internas do rRNA) utilizando primers gênero específico. Esses primers são capazes de amplificar a maior parte (se não todas) das espécies associadas à leishmaniose humana. Dessa forma, após a amplificação, as espécies são identificadas com base no sequenciamento dos amplicons.

O conhecimento das espécies que circulam numa determinada região é também um fator importante na escolha de um protocolo de PCR. Em geral, os protocolos de diagnóstico utilizados nas Américas não incluem as espécies que são características do velho mundo e da África, assim como os testes realizados nessas áreas e no sul da Europa não incluem as espécies encontradas nas Américas. Isso pode ser um problema quando o paciente viaja para uma ou mais áreas endêmicas. Nesse sentido, o histórico de viagem do paciente é um fator fundamental na definição da estratégia a ser usada para proceder ao diagnóstico. Um exemplo da importância do histórico de viagem dos pacientes no diagnóstico da leishmaniose pode ser exemplificado pelos casos diagnosticados nos Estados Unidos. Embora esse não seja um país endêmico para leishmaniose, são identificados anualmente cerca de 100 casos positivos. Esses casos são associados com pelo menos 10 espécies de *Leishmania*, pertencentes a diferentes regiões endêmicas (de Almeida, 2010). Por serem reações de alto poder de amplificação, a possiblidade de amplificações espúrias que podem resultar em falsos positivos deve ser a principal preocupação nos laboratórios que utilizam as PCR como procedimento padrão de diagnóstico. Nesse sentido, é muito importante observar certas práticas que tendem a diminuir as amplificações inespecíficas, entre as quais se incluem: 1) sempre que possível, separar áreas contendo equipamentos, materiais e vestuário de proteção (aventais e luvas) para as seguintes operações: extração de DNA, preparação das reações (master-mix), adição do DNA na reação e, principalmente, restringir a manipulação de produtos amplificados a uma área exclusiva; 2) uso de controles (negativos e positivos) nos procedimentos de extração de DNA e de amplificação; 3) utilizar protocolos que minimizem a manipulação de instrumentos e reagentes na preparação das reações. Dois exemplos desse item são: a) utilizar preferencialmente reagentes previamente misturados (master-mix) ao invés de reagentes separados na preparação das reações de PCR e b) utilizar protocolos que sejam capazes de diferenciar o maior número de espécies possível; 4) fazer alíquotas dos reagentes utiliza-

dos em cada etapa do procedimento é também uma forma de reduzir a possibilidade de contaminação. Entre as principais técnicas moleculares para o diagnóstico da leishmaniose, encontram-se:

- **PCR convencional:** Essa técnica é baseada na amplificação de segmentos do DNA de *Leishmania* spp. utilizando "primers" genéricos ou específicos para determinadas espécies. As reações genéricas requerem, necessariamente, a análise dos produtos amplificados para identificação das espécies. Dependendo do alvo escolhido, o protocolo pode diferenciar múltiplas espécies em uma única reação e, por isso, torna-se uma ferramenta muito útil na identificação das espécies. Dentre os procedimentos de análise dos fragmentos amplificados por PCR, destacam-se:
- **Sequenciamento pelo método de Sanger:** Dependendo da qualidade dos produtos amplificados, essa técnica permite a identificação das espécies pelo sequenciamento direto dos produtos amplificados utilizando os mesmos "primers" usados na PCR ou "primers" internos aos "amplicons". Como o resultado é baseado na sequência do fragmento de DNA amplificado, o nível de confiabilidade da identificação das espécies nesse procedimento é de 100%. A amplificação por PCR genérico seguida do sequenciamento é o procedimento padrão de identificação de *Leishmania* spp. em laboratórios de referência, como no US-CDC – Atlanta, GA, EUA (de Almeida, 2011).

Devido aos progressos da tecnologia aplicada ao diagnóstico molecular, há alguns anos foi criado um novo sistema de identificação das espécies de *Leishmania*, a tipagem por sequenciamento "multi-target" (multilocus sequence typing – MLST). Nesse procedimento, o gene de algumas proteínas utilizadas na MLEE é amplificado e posteriormente sequenciado. A combinação dos resultados das sequências desses "amplicons" permite a identificação específica das espécies. Em comparação a tradicional MLEE, a MLST é um procedimento menos trabalhoso, mais específico e rápido. Entretanto, atualmente o custo elevado é a principal desvantagem dessa metodologia.

- **RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP):** A análise dos fragmentos amplificados por PCR utilizando enzimas de restrição é outra ferramenta bastante utilizada na identificação das cepas e espécies de *Leishmania*. Nesse procedimento, os produtos amplificados por PCR são digeridos por enzimas de restrição e o perfil eletroforético dessa fragmentação permite a identificação desses produtos. A capacidade de discriminação das espécies ou cepas depende da eficiência da reação de PCR, ou seja, da escolha das regiões do DNA que permitam a distinção das espécies desejadas e a qualidade dos produtos amplificados, que geralmente é determinada pela especificidade dos "primers". Trata-se de uma técnica de custo bastante acessível, mas cujo nível de confiabilidade do teste é limitado em relação a técnicas mais poderosas, como o sequenciamento do DNA.
- **Amplificação Randômica do DNA (*Random Amplified Polymorphic* DNA – RAPD):** Nesse procedimento, as reações de PCR são preparadas com uma série de "primers" curtos (8 a 12 nucleotídeos) usados para amplificar aleatoriamente o DNA genômico e, assim, espera-se que os fragmentos amplificados criem um padrão eletroforético para os organismos investigados. No caso da *Leishmania*, essa técnica é usada para discriminar espécies e algumas cepas. A eficiência do teste depende basicamente da qualidade do DNA usado como molde, ou seja, o comprometimento dos resultados está associado à fragmentação do DNA genômico. Esse fato gera padrões diferentes para uma mesma espécie (ou cepa), tornando o poder de discriminação do teste inadequado.
- **PCR de tempo real:** Atualmente, o PCR em tempo real é uma das técnicas mais utilizadas para discriminação de microrganismos, incluindo *Leishmania* spp. Já foram desenvolvidos testes baseados na tecnologia TaqMan® e também SYBR® Green. Por serem baseadas na amplificação de pequenos segmentos de DNA e na utilização de marcadores fluorescentes, essas técnicas são na maioria das vezes muito mais sensíveis (e não menos específicas) do que as PCR convencionais. No caso do TaqMan® as reações podem ser preparadas com primers genéricos e sondas específicas para determinadas espécies. O SYBR® Green é uma técnica que não requer a utilização de sondas marcadas, as reações baseadas nessa tecnologia são mais simples de serem ajustadas e mais baratas em relação ao TaqMan®. O problema dessa técnica são os falsos positivos. Uma vez que as moléculas do SYBR® Green se intercalam entre as duplas fitas de DNA, não há distinção entre os produtos específicos e os produtos inespecíficos. Entretanto, a utilização da curva de dissociação dos produtos amplificados é uma boa estratégia para diferenciar os produtos inespecíficos dos produtos específicos.

Alternativas inovadoras na detecção de infecção por *Leishmania* são o Ensaio de Ácidos Nucleicos (NASBA), cuja metodologia é baseada no sequenciamento genético das amostras obtidas na PCR, e as variações em suas aplicações, como o ensaio de ácidos nucleicos quantitativo (QT-NASBA), ou então acoplado a um sistema de cromatografia (NASBA-OC). Esses testes vêm sendo utilizados para avaliar a eficácia de potenciais fármacos para o tratamento de leishmaniose visceral, por meio da quantificação estimada da carga parasitária no sangue de pacientes infectados (Vries e col., 2006). A NASBA-OC faz uso de uma membrana sensibilizada para detecção da oligocromatografia do RNA amplificado, onde a leitura se faz em um curto período de tempo (5 a 10 minutos) (Mugasa e col., 2010). O QT-NASBA utiliza a eletroquimiluminescência como ferramenta de detecção, o que o torna mais delicado em sua manipulação e exige maior tempo na realização do procedimento, quando comparado ao qPCR (Van der Meide e col., 2008).

O LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) tem sido visto como uma ferramenta promissora no diagnóstico da leishmaniose visceral. Adotado como uma técnica alternativa à PCR convencional, o LAMP é considerado uma opção mais acessível financeiramente e tecnicamente e mais rápida, em que a turbidez da amostra é utilizada como critério de positividade nos casos de infecção. Essa técnica não faz uso de termociclador, de maneira que as amostras são dispostas em banho-maria ou em um bloco aquecido com poucas oscilações de temperatura, onde ocorre a reação isotérmica, podendo ser considerada ferramenta útil na aplicação em atividades de campo (Khan e col., 2012).

PREVENÇÃO E CONTROLE

Como não há vacinas ou drogas que previnam a doença, a melhor forma de prevenir a infecção é minimizar as picadas dos mosquitos. Sempre que possível, deve-se evitar atividades noturnas nas áreas endêmicas, utilizar roupas de mangas longas e repelentes nas partes expostas da pele. O controle de vetores pelo uso de inseticidas e de animais que servem de hospedeiros para o parasita são práticas eficientes na prevenção da doença em certas regiões. Além disso, o diagnóstico precoce e o tratamento apropriado são práticas importantes para se evitar a transmissão antroponótica (humano-vetor-humano) da doença.

Trypanosoma Cruzi

Silvia Maria Spalding

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas resulta da infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, descrito em 1909 pelo brasileiro Carlos Chagas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 18 milhões de pessoas são cronicamente infectadas pelo protozoário, cerca de 65 milhões de pessoas correm o risco de serem infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* por viverem em áreas endêmicas, e que ocorram cerca de duzentos mil novos casos por ano (Rassi e col., 2007). Estima-se que, na América Latina, são perdidos anualmente cerca de 1,2 bilhões de dólares devido à doença (Lee e col., 2010), o que indica o impacto socioeconômico da infecção. Essa doença constitui um grande desafio para a saúde pública, com prevalência de infecção humana em 21 países do continente americano. Estima-se que cerca de 6 a 8 milhões de pessoas estejam infectadas principalmente na América Latina (OPAS, 2014). No Brasil, a doença humana ocorre em uma população de aproximadamente quatro milhões de indivíduos e mais de 28 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contaminação (Massad, 2008).

EPIDEMIOLOGIA

É considerada uma doença com distribuição geográfica limitada, distribuída do sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile. Porém, associada com os processos de migração populacional, os imigrantes podem ser fonte de introdução da doença em países não endêmicos. Transfusão de sangue, doação de órgãos e infecção congênita são os modos primários de infecção nos países de destino dos imigrantes infectados pelo *T. cruzi*. Sendo assim, podemos observar um grande número de casos da doença em países não endêmicos, como a Austrália, Canadá e Espanha (Schmunis, 2007).

Devido à diversidade encontrada no *T. cruzi* em relação a suas características morfobiológicas, bioquímicas e genéticas, foram sugeridas várias classificações para este parasito, designadas como cepas; destaca-se a de Andrade, 1985, baseada em parâmetros biológicos, conforme descrito no Quadro 44.1.

Quadro 44.1 Classificação para o parasito *Trypanosoma cruzi*.

Cepa	Característica
Tipo I	Multiplicação rápida, parasitemia elevada, alta mortalidade, predomínio de formas delgadas e tropismo pelos macrófagos na fase inicial da infecção.
Tipo II	Multiplicação relativamente lenta, picos irregulares de parasitemia, alta mortalidade, predomínio de formas largas no início da infecção e miotropismo com acentuada predileção pelo miocárdio.
Tipo III	Multiplicação lenta, elevada parasitemia tardia (12 a 30 dias após a inoculação), baixa mortalidade, predomínio de formas largas e miotropismo para músculos esqueléticos.

Fonte: Andrade SG., 1985.

Em 2006, o Brasil foi certificado pela Organização Panamericana de Saúde como livre da transmissão vetorial da doença de Chagas, por *Triatoma infestans*; entretanto outras espécies de triatomíneos têm sido associadas com a transmissão de *T. cruzi* em meios rural e periurbano.

TRANSMISSÃO

A maioria das infecções pelo protozoário é adquirida pelo contato da pele ou mucosa de mamíferos hospedeiros com a urina ou fezes do inseto infectado pelo parasito, em suas formas tripomastigota e epimastigota, das fezes do inseto hematófago. Os vetores da infecção são insetos hematófagos da subfamília Triatominae, família Reduviidae, gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, conhecidos popularmente por "barbeiro". O *T. cruzi* é capaz de infectar mais de 100 espécies de mamíferos de diferentes ordens, incluindo animais domésticos e silvestres.

Além disso, vias de transmissão independentes de vetores ocorrem em alguns casos de contaminação acidental, em laboratórios, através de transfusão sanguínea, transmissão congênita, transplante de órgão e, mais recentemente, devido à contaminação via oral pela ingestão de alimentos contaminados (acerola, açaí, caldo de cana) (Barbosa-Ferreira e col., 2010; Magalhães-Santos, 2014).

CICLO DE VIDA

O *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, é caracterizado pela presença de um flagelo e uma única mitocôndria. No sangue dos vertebrados, está na forma de tripomastigota e, nos tecidos, como amastigotas. Nos invertebrados (insetos vetores), ocorre um ciclo com a transformação dos tripomastigotas sanguíneos em epimastigotas, que depois se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectantes localizadas nas fezes do inseto.

A forma infectante, tripomastigota, infecta a maioria dos tipos celulares de mamíferos, incluindo fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, cardiomiócitos e macrófagos. A internalização do parasito se inicia por meio de adesão à célula hospedeira. A adesão decorre de um processo de reconhecimento celular, no qual glicoproteínas e proteínas do tipo lectina, presentes tanto na célula hospedeira quanto no parasito, estão envolvidas. Tripomastigotas entram nas células hospedeiras e rompem o vacúolo parasitóforo, pela ação de uma proteína lítica dependente de pH ácido, e se diferenciam na forma amastigota, que é capaz de se replicar no citosol. Quando a célula hospedeira se rompe, muitas formas infectantes desse flagelado são liberadas no espaço intersticial, podendo infectar células adjacentes ou penetrar na corrente sanguínea, possibilitando a infecção de outros órgãos ou tecidos. As formas tripomastigotas presentes na corrente sanguínea são as responsáveis pela disseminação da doença, pois são essas as formas infectantes ingeridas pelo inseto vetor. Os parasitos são levados ao estômago do inseto, onde as formas tripomastigotas sofrem outra diferenciação e, em seguida, migram para o intestino, onde se multiplicam como formas epimastigotas. Ao migrarem para o reto do triatomínio, o parasito transforma-se na forma tripomastigota metacíclica infectante, sendo eliminado juntamente com as fezes e urina do inseto, iniciando novamente o ciclo (de Souza, 2000).

PATOGENIA E ASPECTOS CLÍNICOS

A doença pode ser classificada em fase aguda, que se deve à infecção pelo protozoário ou à reativação durante fase crônica, e fase crônica. A fase aguda dura de 6 a 8 semanas e, muitas vezes, o paciente possui quadro clínico caracterizado por picos febris, taquicardia, edema, entre outros sintomas, embora possa ser assintomático. Após, segue um longo período de latência, correspondente à cronificação da doença, no qual o indivíduo é assintomático, com exames clínicos e complementares de tórax e aparelho digestivo sem alterações, além de eletrocardiograma sem irregularidades do ritmo. Tal período é caracterizado pela presença de anticorpos anti-*T. cruzi*. A fase crônica inclui diversas condições clínicas: a forma indeterminada, na qual o paciente não tem cardiopatia estrutural e/ou alterações digestivas; a forma cardíaca, que pode culminar ou não em disfunção ventricular; e a forma digestiva, principalmente com acometimento do esôfago e do colo. As formas cardíaca e digestiva podem ou não vir combinadas. As manifestações clínicas da fase crônica refletem o dano aos tecidos dos órgãos do trato digestivo e coração (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2011).

A miocardiopatia chagásica e a insuficiência cardíaca congestiva decorrente desta podem se manifestar até muitas décadas após a infecção primária pelo protozoário. A cardiopatia chagásica crônica pode se manifestar por sinais de insuficiência ventricular, distúrbios de condução e arritmias (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2011).

A seguir estão as definições de casos suspeitos de doença aguda e confirmado de congênita, efetuadas pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2009):

1. **Caso suspeito da doença de Chagas aguda**: É considerada pessoa com febre prolongada (> 7 dias) e um ou mais das seguintes manifestações clínicas: edema de face ou de membros, exantema, adenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, cardiopatia aguda, manifestações hemorrágicas, icterícia, sinal de Romaña ou chagoma de inoculação; residente/visitante de área com ocorrência de triatomíneos, ou que tenha sido recentemente transfundido /transplantado, ou que tenha ingerido alimento suspeito de contaminação pelo *T. cruzi*.
2. **Caso confirmado da doença de Chagas congênita:** É recém-nascido de mãe com exame parasitológico ou sorológico positivo para *T. cruzi* e que apresente: exame parasitológico positivo a partir do nascimento ou exame sorológico positivo a partir do oitavo ou nono mês de nascimento e sem evidência de infecção por outras formas de transmissão.

É critério parasitológico de confirmação de doença de Chagas aguda: a presença de *T. cruzi* circulante no sangue periférico identificado por exame parasitológico direto, com ou sem identificação de qualquer sinal ou sintoma. São critérios sorológicos: sorologia positiva com anticorpos da classe IgM anti-*T. cruzi* na presença de evidências clínicas e epidemiológicas indicativas de doença de Chagas aguda; sorologia positiva com anticorpos da classe IgG anti-*T. cruzi* por IFI com alteração na concentração de IgG de pelo menos três títulos em um intervalo mínimo de 21 dias em amostras pareadas; soroconversão em amostras pareadas com intervalo mínimo de 21 dias, ou seja, sorologia negativa na primeira amostra e positiva na segunda, por qualquer método.

São considerados critérios clínico-epidemiológicos: os exames parasitológicos e sorológicos inicialmente negativos na presença de quadro febril com manifestações clínicas compatíveis com doença de Chagas aguda em pacientes com vínculo epidemiológico com casos confirmados de doença de Chagas aguda durante surto por transmissão oral; chagoma de inoculação; sinal de Romaña; miocardiopatia aguda após contato com triatomíneo (por exemplo, ter encontrado o mosquito *barbeiro* no interior do domicílio, ter sido picado por *barbeiro* etc.).

No Brasil, o benzonidazol é a única droga atualmente disponível para o tratamento da tripanossomíase americana (Pontes e col., 2010). O nifurtimox, existente na América Central, pode ser utilizado como alternativa em casos não satisfatórios, como a intolerância ao benzonidazol (Brasil, 2005).

O nifurtimox e o benzonidazol são dotados de atividade não apenas sobre as formas tripomastigotas, mas, também, sobre as formas intracelulares (amastigotas), o que representou significativo avanço na terapêutica específica da infecção.

O tratamento em crianças, nos pacientes com a forma crônica indeterminada, com formas cardíacas ou digestivas leves é recomendado com o objetivo de controlar a doença, diminuir a possibilidade de transmissão do parasito e, principalmente, a cura da infecção (Brasil, 2009).

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Na **fase aguda** da doença, em que ocorre alta parasitemia, podem ser utilizados métodos de diagnóstico para detecção direta do parasito, o *Trypanosoma cruzi*, evidenciado pelo exame a fresco ou por método de concentração (Figura 44.32).

Na **fase crônica** são empregados métodos parasitológicos indiretos para demonstrar o parasito, dentre eles o xenodiagnóstico, a hemocultura (Almeida; Santiliano, 2012), métodos imunológicos e a reação de amplificação de ácidos nucleicos (PCR).

Parasitológico

Consiste na demonstração da forma tripomastigota sanguínea do *T. cruzi* no sangue periférico (exame direto), por meio do exame a fresco, esfregaço sanguíneo ou gota espessa corada pelo método de Giemsa ou pelo método de concentração de Strout. A gota de sangue é examinada entre lâmina e lamínula (20 × 20 mm) com aumento de 400 vezes, sendo necessário examinar 200 campos microscópicos por lâmina, no mínimo, para concluir pela sua negatividade.

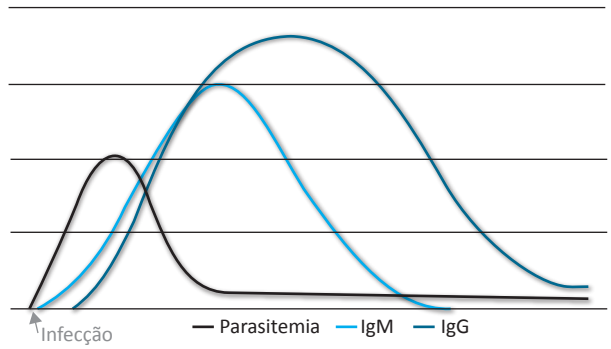


Figura 44.32 Perfil do paciente com a infecção chagásica.
Fonte: https://pt.slideshare.net/rafa12071/protozorios-parasitologia

A técnica de Strout consiste em centrifugar, durante três minutos a 160 G, o soro proveniente de 5 mL de sangue, com nova centrifugação do sobrenadante durante um minuto a 350 a 360G, fazendo-se em seguida o exame do sedimento entre lâmina e lamínula.

Além da sensibilidade e positividade dos testes, o tempo de contaminação da infecção pode afetar o resultado. Em geral a evidenciação de *T. cruzi* pelo exame direto só é útil nas primeiras semanas da doença. Nos primeiros cinco a dez dias a partir da contaminação, o resultado comumente é negativo porque não houve tempo para uma multiplicação satisfatória dos parasitos. Após os 30 dias do início dos sintomas, o número de parasitos circulantes decresce e aparecem os anticorpos IgM anti-*T. cruzi*. Esses aspectos devem ser considerados na hora de avaliar a necessidade de repetir métodos em tempos diferentes da doença (Brasil, 2009).

Quando o exame direto resultar negativo, ele deve ser repetido algumas vezes ao dia (principalmente durante pico febril) durante alguns dias.

Imunológico

O diagnóstico imunológico para doença de Chagas identifica a presença de anticorpos específicos no soro do paciente na fase aguda da infecção (IgM) e se mantém contínuo durante toda a fase crônica da doença (IgG) (Figura 44.33).

O diagnóstico precoce da doença de Chagas é importante para implantar o tratamento inicial, visando a redução das graves consequências da infecção pelo *T. cruzi*. O diagnóstico deve se basear na combinação de resultados laboratoriais, na história clínica e epidemiológica e na detecção do parasito.

Na fase crônica da infecção ocorre uma baixa parasitemia e a presença de anticorpos específicos IgG anti-*T. cruzi* e é indicada a realização de testes com elevada sensibilidade: hemaglutinação indireta ou passiva (HAI), imunofluorescência indireta (IFI) e o método imunoenzimático (Elisa). Para evitar resultados falso-positivos ou falso-negativos, devem ser realizadas duas metodologias diferentes.

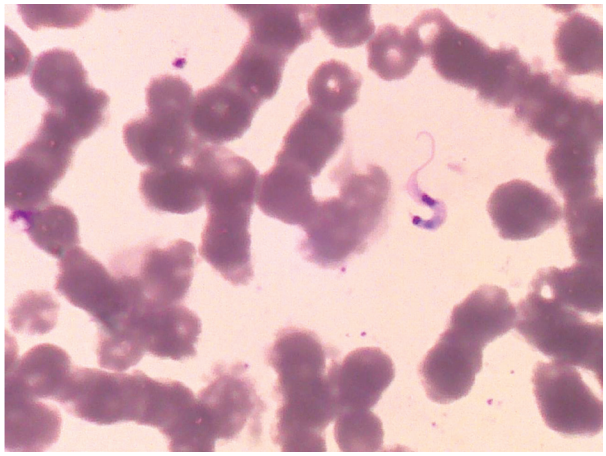


Figura 44.33 Esfregaço de sangue contendo forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* em sangue periférico corado pelo Giemsa (objetiva 100×).
Fonte: Matos SB, 2013

Os exames diagnósticos são realizados nas seguintes situações: em casos incomuns de pacientes sintomáticos ou com cardiopatia compatível à da doença, em imunossuprimidos com diagnóstico prévio, em gestantes, em recém-nascidos de mães já diagnosticadas, para a obtenção de prognóstico de pacientes já diagnosticados, para monitoramento da efetividade do tratamento e em exames de triagem realizados para doação de sangue e transplante (Marcipar e Lagier, 2012).

O Western Blot ou Imunoblot também pode ser utilizado para o diagnóstico da doença de Chagas e possui sensibilidade e especificidade de 100% (Furuchó e col., 2008). Nesta técnica, o antígeno de *T. cruzi* é submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida para separação das proteínas desnaturadas de acordo com sua massa molecular. Em seguida, o material fracionado no gel é transferido para uma membrana de nitrocelulose, os soros teste são adicionados e a reação antígeno-anticorpo é evidenciada pelo aparecimento de bandas características. Um dos exemplos dessa técnica é o teste comercial TESA-blot (trypomastigote excreted-secreted antigens-blot), que utiliza frações das formas infectantes do *T. cruzi* no formato de Imunoblotting e tem apresentado ótimo desempenho (Frade e col., 2011).

Mais recentemente, a citometria de fluxo, que é um método sensível para a detecção de anticorpos, tem apresentado resultados promissores para o diagnóstico e para a avaliação da eficácia terapêutica na doença de Chagas. A metodologia TRIPLEX (FC-TRIPLEX-IgG1) é um teste confirmatório de elevada sensibilidade e especificidade que utiliza a citometria de fluxo para verificar a reatividade diferencial de anticorpos antitripanossomatídeos. (Matos e col., 2011).

A Portaria 158 determina a obrigatoriedade de realização de metodologia imunoenzimática ou de quimioluminescência para a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* na triagem de doadores de sangue (Brasil, 2016).

O diagnóstico da doença de Chagas é difícil, tanto em laboratórios de rotina que tratam de infecções suspeitas como na triagem de laboratórios (bancos de sangue, bancos de sangue do cordão umbilical, doadores de órgãos etc.). Embora existam vários ensaios disponíveis para o diagnóstico imunológico (Elisa, HAI e IFI), não há uma técnica-padrão de ouro, e os resultados obtidos por meio de técnicas diferentes mostram desacordo, com diferentes níveis de sensibilidade e especificidade. A fonte da cepa utilizada para se obter o antígeno pode produzir diferenças de desempenho da técnica, com resultados melhores com antígenos de cepas locais de *T. cruzi*. Reações inespecíficas, causando positivos inconclusivos ou falsos, podem ocorrer no diagnóstico da doença de Chagas, mais frequentemente por anticorpos produzidos por pacientes com leishmaniose. Alguns testes confirmatórios têm sido descritos para sorologia convencional em situações duvidosas, como tripomastigota excretados-secretados antígeno-blot (TESA-blot), INNO-LIA Chagas (linha imunoensaio), 20 RIPA (ensaio de precipitação radioimune) e immunoassay Abott Chagas TESA-blot, que mostra alta sensibilidade e especificidade em diferentes grupos de pacientes, em comparação com aqueles de métodos sorológicos convencionais. Ela tem sido usada como o padrão-ouro na sorologia da doença. TESA-blot de Chagas é considerada positiva quando soros reagem com antígenos de 130–200 kDa e/ou antígenos de 150–160 kDa, e alguns soros também reagem com bandas de 80–120 kDa (SAPA – antígeno de fase aguda).Vários pacientes crônicos também reagem com bandas SAPA além de uma faixa de aproximadamente 95 kDa (Araujo & Berne, 2013).

Para a obtenção de resultados mais seguros no diagnóstico da doença de Chagas crônica, a OMS preconiza a realização de dois testes sorológicos de princípios metodológicos diferentes: um que apresente elevada sensibilidade, como a RIFI ou o Elisa, utilizando antígeno total ou frações semipurificadas do *T. cruzi*, acompanhado de outro com elevada especificidade, como o teste Elisa, utilizando antígenos recombinantes específicos do *T. cruzi* (recElisa) (MS, 2010; de Almeida e Santiliano, 2012).

No caso de resultados duvidosos, as reações devem ser repetidas e outras técnicas devem ser empregadas. Se dois métodos apresentarem resultados contraditórios, é recomendada a realização de um terceiro método de princípio diferente. Caso permaneça a dúvida, deve-se realizar um quarto método de imunodiagnóstico ou até um método não imunológico. Assim, quando a sorologia é duvidosa ou se deseja verificar a eficácia do tratamento, métodos parasitológicos indiretos, como a PCR, podem ser necessários (de Lana e Tafuri, 2011; Marcipar e Lagier, 2012).

Um estudo recente comprovando a segurança e efetividade de alguns testes rápidos para diagnóstico da doença de Chagas pode fazer com que haja alterações na recomendação da OMS, fato que aumentaria a agilidade do diagnóstico em campo e, consequentemente, do tratamento aos infectados. O estudo foi realizado em laboratórios de diversos países e, na próxima etapa, pretende-se avaliar o desempenho dos mesmos testes rápidos em campo (Sánchez e col., 2014).

Molecular

A detecção molecular da infecção por *T. cruzi* é feita por meio da técnica de PCR. Entretanto, apresenta uso restrito e realização em centros com caráter experimental. Devem ser desenvolvidos protocolos definidos e procedimentos operacionais padronizados (POP) para posterior ampla utilização. É uma metodologia de detecção indicada para casos em que o paciente se apresenta na fase crônica da doença (Ministério da Saúde, 2005).

São utilizados dois pares de iniciadores que amplificam sequências de *T. cruzi* em alvos diferentes, uma sequência de DNA genômico de 188 pb (TCZ1/TCZ2) e do DNA do cinetoplasto de 330 pb (S35/S36), a melhor sensibilidade foi observada para os iniciadores de 188 pb. Esses iniciadores conferiram uma sensibilidade de 5 fg, o que representa menos de um parasito (Gilber e col., 2013).

Para melhorar a sensibilidade da PCR é usada a *nested* PCR, que atua realizando duas amplificações consecutivas do gene alvo. Esta variação da técnica tem se mostrado rápida, bastante sensível e com um limite de detecção aproximado de 0,01 parasito (Gilber e col., 2013).

A técnica de PCR tem como vantagens a alta sensibilidade e especificidade, rápida identificação do parasito, quando comparada com os métodos tradicionais de diagnóstico. Essas vantagens fazem da técnica de PCR uma possível ferramenta a ser usada quando os métodos convencionais não forem decisivos para determinação do parasito.

A técnica *Real Time* PCR representa um avanço significante na área de diagnóstico da doença chagásica. Ela permite a quantificação precisa dos produtos de PCR durante a fase exponencial da amplificação, diferente da PCR clássica, onde a sua quantificação é obtida só no final. A *performance* da técnica de *Real Time* PCR depende da qualidade na extração do DNA e utiliza sondas fluorescentes com sequências específicas, onde estas hibridizam com a sequência alvo e emitem um sinal fluorescente. O sistema de detecção possibilita a correlação entre a intensidade do sinal com a quantidade do produto amplificado, aumentando, assim, a precisão e a exatidão do método (Duffy e col., 2013).

A *Real Time* PCR permite a quantificação de sequências de DNA de forma mais rápida, precisa e sensível. Dessa forma, o desenvolvimento de *Real Time* PCR para a quantificação de *T. cruzi* é muito importante como marcador substituto de avaliação da eficácia do tratamento, do diagnóstico em pacientes com doença chagásica e de quantificação da carga parasitária em tecidos infectados (Rendell e col., 2015).

A PCR é realizada para os casos de transmissão por transfusão, transplantes, congênita ou por exposições laboratoriais. No CDC (Centers of Desease Control and Prevention) a detecção molecular do DNA de *T. cruzi* é realizada usando uma combinação de três ensaios de PCR em tempo real.

A doença de Chagas, pela prevalência, pela gravidade de suas manifestações, constitui, ainda hoje, um problema de saúde pública. Mesmo com a diminuição da transmissão da doença de Chagas nos últimos anos, a correta identificação dos portadores dessa enfermidade e as ações de controle do triatomíneo são de fundamental importância para a saúde pública do país.

Plasmodium spp.

Alexandre Januário da Sliva

INTRODUÇÃO

A malária ou uma enfermidade semelhante à malária foi observada há mais de 4.000 anos. As referências às febres periódicas únicas de malária são encontradas ao longo da história, a partir de 2700 a.C., na China. Hipócrates descreveu febres periódicas, rotulando-as como febre terçã, quartã, subterçã e cotidiana. A malária pode até ter contribuído para o declínio do Império Romano, e foi tão difundida em Roma, que era conhecida como a "febre romana". Várias regiões na Roma antiga eram consideradas de risco para a doença, por causa das condições favoráveis presentes para vetores da malária. Isto incluiu áreas como o sul da Itália, a ilha da Sardenha, os Pântanos Pontine, as regiões mais baixas da Etrúria costeira e da cidade de Roma ao longo do rio Tibre. A presença de água parada nesses locais foi considerada como sítios adequados de reprodução dos mosquitos, o que foi crucial para a disseminação da doença nessas regiões. O termo malária origina da linguagem medieval italiana: *mala aria* – "ar ruim"; a doença foi anteriormente chamada de febre ou febre do pântano, devido à sua associação com pântanos e manguezais. O termo apareceu pela primeira vez na literatura em inglês por volta de 1829.

Existem aproximadamente 156 espécies do gênero *Plasmodium* que infectam várias espécies de vertebrados. Quatro espécies desse protozoário são consideradas causadoras de malária humana, uma vez que as mesmas utilizam os seres

humanos quase exclusivamente como um hospedeiro intermediário natural. Essas espécies são: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. No Brasil, até o momento, dentre essas quatro espécies, o *Plasmodium ovale* não foi identificado como causador de malária humana.

Existem relatos de outras espécies de *Plasmodium* encontradas em símios que podem causar malária em seres humanos. A maioria dos casos estudados de malária humana causada por espécies zoonóticas se refere ao *Plasmodium knowlesi*. No momento da redação deste texto, não havia sido determinado se *P. knowlesi* poderia estar sendo naturalmente transmitido entre seres humanos através do mosquito, sem o envolvimento do hospedeiro intermediário natural (macacos, gênero *Macaca*). Por essa razão, o *P. knowlesi* ainda é considerado uma espécie de origem zoonótica. Os casos de *P. knowlesi* vêm sendo registrados no sudeste da Ásia. Entretanto, um caso de malária importada causada por *P. knowlesi* foi registrado em um paciente dos Estados Unidos que viajou para uma das áreas do mundo onde casos de infecção por *P. knowlesi* haviam sido previamente estudados.

EPIDEMIOLOGIA

Em 2012, foi estimado que cerca de 627.000 pessoas morreram de malária, sendo a maioria crianças residentes da África subsaariana. Na última década, um número crescente de recursos tem sido utilizado no controle de malária, e esse aumento de escala das intervenções salvou aproximadamente 3,3 milhões de vidas no mundo todo. Essas intervenções também diminuíram a mortalidade mundial causada por malária em 45%. Entretanto, ainda existem muitos desafios para o controle total, com o objetivo da eliminação da doença. Os países da África são os mais afetados por esta endemia, e o controle da malária em certas áreas tem sido extremamente difícil, por uma série de motivos: 1) mosquitos vetores que transmitem a malária com alto índice de eficiência e resistentes a tratamento com inseticidas; 2) alta prevalência das espécies mais mortais do protozoário; 3) clima favorável e infraestrutura inadequada para o combate da doença; 4) custos elevados de intervenção que são difíceis manter em países ou regiões com alto índice de pobreza. A malária geralmente ocorre em áreas onde as condições ambientais permitem a multiplicação do *Plasmodium* no vetor, isto é, nos mosquitos do gênero *Anopheles*. A malária está normalmente restrita a áreas tropicais e subtropicais e altitudes inferiores a 1.500 m, embora já tenha sido endêmica em grande parte da América do Norte, Europa e até mesmo partes do norte da Ásia.

No Brasil, a sua grande área endêmica é formada por todos os estados da Amazônia Legal. Essa distribuição poderia ser afetada por mudanças climáticas e movimentos populacionais, e, por isso, existe sempre uma preocupação com a vigilância sanitária em países que não são considerados endêmicos para malária. O *P. falciparum* é a espécie mais prevalente e predominante em todo o mundo. O *P. vivax* e o *P. ovale* ocupam tradicionalmente nichos complementares nas áreas onde se verifica a presença do *P. falciparum*, com o *P. ovale* predominando na África subsaariana e o *P. vivax* nas outras áreas, como, por exemplo, nas Américas do Sul e Central. Mesmo assim, essas duas espécies se sobrepõem em suas distribuições geográficas. Essas duas espécies nem sempre são distinguíveis com base em características morfológicas por si só, e o uso de ferramentas moleculares ajudam a esclarecer o seu diagnóstico e exata distribuição. *P. malariae* tem ampla distribuição mundial, sendo encontrado na América do Sul, Ásia e África, mas é menos frequente do que o *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* em termos de associação com casos de infecção.

TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA

O ciclo de vida do *Plasmodium* spp. envolve dois hospedeiros. O mosquito fêmea do gênero *Anopheles* pica o indivíduo para utilizar o sangue como nutriente para os ovos. Com isso, o mosquito infectado inocula esporozoítos no hospedeiro humano. Em seguida, os esporozoítos infectam as células do fígado e amadurecem em esquizontes. Nessa etapa do ciclo, *P. vivax* e *P. ovale* podem desenvolver uma fase dormente (hipnozoítos) e persistir no fígado por um período longo (meses ou anos), podendo causar recaídas, invadindo a corrente sanguínea. As células hepáticas infectadas com os esquizontes se rompem liberando merozoítos para a corrente sanguínea, e esses merozoítos iniciam o ciclo eritrocítico ao infectarem os eritrócitos circulantes. Em seguida, os parasitos iniciam a multiplicação assexuada dentro dos eritrócitos. Inicialmente, eles se transformam em trofozoítos em estágio de anel, maturam em esquizontes, que se rompem liberando merozoítos. Alguns merozoítos se diferenciam em estágios eritrocitários sexuais (gametócitos). Os estágios do *Plasmodium* no sangue são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. Os gametócitos do sexo masculino (microgametócitos) e feminino (macrogametócitos) são ingeridos pelo mosquito *Anopheles* durante a picada no indivíduo infectado. A multiplicação do protozoário no mosquito é conhecida como ciclo esporogônico. No estômago do mosquito, os microgametas irão fecundar os macrogametas, gerando zigotos. Os zigotos, por sua vez, tornam-se móveis e alongados (oocinetos), que invadem a parede do intestino médio do mosquito e se desenvolvem em oocistos. Os oocistos crescem, as células infectadas se rompem liberando esporozoítos, que migram para as glândulas salivares do mosquito. A inoculação dos esporozoítos em um novo hospedeiro humano perpetua o ciclo de vida do *Plasmodium* spp.

A transmissão da malária também pode ocorrer por meio do contato direto com o sangue de uma pessoa infectada, como, por exemplo, em transfusões de sangue, transplantes de órgãos ou, ainda, pelo compartilhamento de seringas entre usuários de drogas injetáveis.

PATOGENIA E ASPECTOS CLÍNICOS

Os sintomas da malária podem não ser específicos, e o diagnóstico clínico pode ser confundido com outras doenças febris se o médico não estiver atento para os dados epidemiológicos apresentados pelo paciente. Como a malária

não tratada pode evoluir para formas graves que podem ser rapidamente (<24 horas) fatais, a enfermidade deve ser sempre considerada em pacientes que têm uma história de exposição, principalmente viagens passadas ou residência em áreas endêmicas. Os sintomas mais frequentes são febre alta, suor e calafrios, que podem ser acompanhados de dor de cabeça, mialgias, artralgias, fraqueza, vômitos e diarreia. Outras características clínicas incluem esplenomegalia, anemia, trombocitopenia, hipoglicemia, disfunção pulmonar ou renal, e alterações neurológicas. A apresentação clínica pode variar substancialmente, dependendo das espécies infectantes, do nível de parasitemia e do estado imunitário do paciente. As infecções causadas por *P. falciparum* são as mais propensas a evoluir para formas graves, potencialmente fatais com envolvimento do sistema nervoso central (malária cerebral), insuficiência renal aguda, anemia grave, ou mesmo síndrome respiratória aguda. Outras espécies também podem apresentar manifestações graves. As complicações da malária por *P. vivax* incluem esplenomegalia (com, raramente, ruptura do baço), e as de formas graves de infecções por *P. malariae* podem incluir síndrome nefrótica.

■ DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Exame parasitológico do sangue

A microscopia (análise morfológica) continua sendo o "padrão ouro" para o diagnóstico da malária. As formas parasitárias das espécies de *Plasmodium* podem ser visualizadas em esfregaços de sangue ou gota espessa corados com colorações de Giemsa, Wright, ou Wright-Giemsa. A coloração de Giemsa é preferida, uma vez que permite a detecção de certas características morfológicas, como, por exemplo, granulações de Schuffner e granulações de Maurer, que não podem ser vistas com as outras colorações. Os exames em gota espessa são normalmente utilizados para detectar a presença do protozoário e quantificar as formas presentes para uma estimativa precisa da parasitemia. Os esfregaços são mais específicos e utilizados para a identificação do *Plasmodium* em nível de espécie, uma vez que as características morfológicas são visíveis e distintas nos três estágios do referido protozoário. A identificação diagnóstica das espécies de *Plasmodium* é muito importante para a definição do regime de tratamento. A para as infecções de *P. falciparum*, uma vez que estas podem ser muito mais graves do que as causadas pelas outras espécies. Em adição, a diferenciação também é muito importante no caso das infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale*, pois essas duas espécies requerem tratamento do paciente com medicamentos que potencializam a eliminação de estágios dormentes (hipnozoítos) que podem ser produzidos por ambas as espécies. O tratamento inadequado da malária causada por estas duas espécies pode resultar numa reativação da infecção no paciente meses ou até anos depois da infecção original. A quantificação também pode ser feita em esfregaços, mas, nesse caso, o resultado final determina o número de eritrócitos infectados e não a concentração de parasitos por volume de sangue, como é feito através da quantificação em gota espessa. Em resumo, tanto a gota espessa quanto o esfregaço são elementos essenciais no diagnóstico laboratorial da malária.

Métodos moleculares

Como indicado anteriormente, as características morfológicas das espécies de *Plasmodium* são utilizadas para a determinação diagnóstica das espécies presentes nas amostras clínicas como padrão ouro do diagnóstico laboratorial da malária. Entretanto, as características morfológicas podem não estar apresentadas de forma a garantir uma identificação diagnóstica de total segurança. Em alguns casos, a presença do *Plasmodium* nos esfregaços pode não apresentar todos os estágios necessários para a distinção em nível de espécie. Também se observam casos em que a morfologia do protozoário foi alterada por tratamento medicamentoso ou armazenamento inadequado da amostra. Existem também as situações em que a preparação do esfregaço pode estar abaixo do padrão de qualidade necessário para um diagnóstico definitivo, bem como situações em que o paciente examinado possui uma parasitemia muito baixa e o número de parasitos no esfregaço ou na gota espessa está muito próximo do limite de detecção da técnica de microscopia. Além disso, existem casos em que as características morfológicas podem se sobrepor, por exemplo, *P. vivax* e *P. ovale* possuem características semelhantes em alguns estágios, como a tendência dos trofozoítos maduros de infectar eritrócitos mais jovens e reticulócios que normalmente são maiores do que a média dos eritrócitos no campo microscópico. Outra característica que pode ser semelhante entre *P. vivax* e *P. ovale* se refere à aparência ameboide dos trofozoítos maduros. Todos esses aspectos podem limitar a acurácia do diagnóstico morfológico e, assim, testes que possam oferecer uma análise independente podem ser de grande auxílio na confirmação desses casos.

Os testes moleculares vêm sendo amplamente utilizados no diagnóstico laboratorial da malária, especialmente em laboratórios de referência diagnóstica. Tais testes, como a reação em cadeia da polimerase – PCR, podem detectar o *Plasmodium* spp em amostras onde a parasitemia pode até ser inferior ao nível detectável de exame microscópico. Existe uma série de metodologias moleculares diferentes da PCR que vem sendo desenvolvidas como aplicações no diagnóstico laboratorial da malária, como a técinica de "RealAmp" (do inglês Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification) e ensaios de PCR utilizando *primers* com indutores fluorogênicos, como o PET-PCR (do inglês Photo-Induced Electron Transfer Fluorogenic Polimerase Chain Reaction). RealAmp como o PET-PCR uma aplicação mais direcionada à pesquisa e não ao diagnóstico clínico ou mesmo diagnóstico laboratorial de referência.

Métodos imunocromatográficos

Detecção de antígenos

O avanço diagnóstico propiciou o desenvolvimento de ensaios imunocromatográficos que permitem rápida detecção de proteínas de plasmódios diretamente de uma amostra

de sangue, utilizando anticorpos monoclonais. Esses métodos também conhecidos como testes rápidos vêm se tornando fundamentais para os programas de controle mundial da malária. Uma vez que são de fácil execução, os testes rápidos podem ser implementados em hospitais, clínicas locais ou até mesmo postos de saúde em vilarejos onde o atendimento médico é inexistente ou escasso. Os testes rápidos também têm sido utilizados em países desenvolvidos como os Estados Unidos. Esses testes são extremamente úteis no diagnóstico de casos de malária grave causada normalmente por *P. falciparum* adquirida por indivíduos que viajaram para áreas endêmicas. Nos Estados Unidos existe pelo menos um teste rápido aprovado pelo U.S. FDA para uso direto no diagnóstico clínico da malária, o Binax Now (http://www.alere.com/en/home/support/edu/product-demos/binaxnow/binaxnow-malaria.html). Esse teste, tem um formato um pouco mais complexo do que a maioria dos testes rápidos. A execução do teste se faz com uma amostra de sangue do paciente aplicado ao bloco reservado para amostra no cassete de reação juntamente com os reagentes que acompanham o *kit*. Após 15 minutos, a presença de bandas específicas nas áreas de reação irão indicar se o paciente está infectado com *P. falciparum* ou uma das outras três espécies de malária humana. Recomenda-se que o laboratório mantenha um controle positivo das quatro espécies para controlar a interpretação correta dos resultados. Um vídeo que explica os fundamentos do teste, a execução e interpretação de resultados foi produzido pelo Centers for Disease Control e está disponível na internet no endereço http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/rdt.html.

No Brasil os testes rápidos estão disponíveis para o diagnóstico da malária e são utilizados para diagnóstico da enfermidade causada por diferentes espécies do gênero *Plasmodium*. Alguns exemplos comerciais desses testes exclusivos para diagnóstico de *P. falciparum* são o Check-Pf® e o Malar-Check®, que se baseiam na detecção, no sangue do paciente, da proteína Pf-HRP2, através de anticorpos monoclonais. Os testes que discriminam o *P. falciparum* de outras espécies são o ICT-PfPv® e o OptiMal®, também realizados em fita de nitrocelulose e consistem na detecção, por imunocromatografia, da enzima desidrogenase láctica (pDHL) específica do gênero *Plasmodium*, e de outra específica do *P. falciparum* (Pf-DHL), presente no sangue total do paciente.

Métodos imunológicos

A detecção de anticorpos da malária para o diagnóstico clínico é realizada utilizando diferentes testes imunológicos, como o teste de imunofluorescência indireta. Esses testes, também chamados de testes sorológicos, podem ser usados como uma ferramenta para determinar se um paciente foi infectado pelo *Plasmodium* sp. Entretanto, na maioria das vezes, é bem difícil determinar a espécie infectante, devido ao nível de reação cruzada exibido. Em razão do tempo necessário para o desenvolvimento de anticorpos e também a persistência de anticorpos, testes serológicos não são práticos para diagnóstico de rotina da malária aguda. No entanto, a detecção de anticorpos pode ser útil para triagem de doadores de sangue envolvidos em casos de malária induzida por transfusão, quando a parasitemia do doador pode estar abaixo do nível detectável do exame parasitológico. Reações cruzadas em testes sorológicos também ocorrem frequentemente entre as espécies de *Plasmodium* e espécies de *Babesia*. O procedimento de um teste sorológico por imunofluorescência se baseia na reação do soro do paciente com os parasitas fixados em lâmina de microscopia. Se anticorpos estiverem presentes, os mesmos se ligarão aos antígenos do parasita, formando um complexo antígeno-anticorpo (Ag-Ab). Adiciona-se, então, anticorpo anti-humano marcado com fluoresceína, que se liga aos anticorpos específicos da malária do paciente. A reação positiva se dará quando os parasitas aparecerem fluorescentes ao serem examinados por microscopia de fluorescência (Figura 44.34).

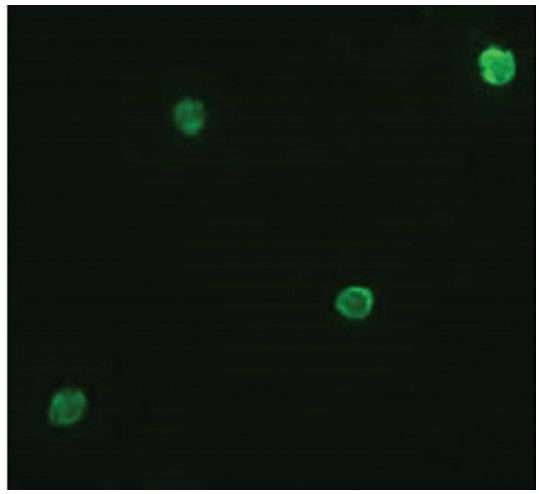


Figura 44.34 Exemplo de uma reação positiva de imunofluorescência. Os parasitas da malária (gametócitos) aparecem fluorescentes quando examinados ao microscópio de fluorescência.
Fonte: http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/dx.html.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE DIFERENTES ESTÁGIOS DAS ESPÉCIES DE *PLASMODIUM*

Plasmodium falciparum

As infecções causadas por *P. falciparum* normalmente são acompanhadas de alta parasitemia com eritrócitos, podendo conter múltiplos estágios de trofozoítos jovens em forma de anel. Esses trofozoítos são normalmente pequenos em comparação com os trofozoítos de *P. vivax* e *P. ovale* e possuem um citoplasma delicado e uma cromatina pequena e bem definida. Alguns trofozoítos jovens podem ser binucleados, ou seja, apresentar duas cromatinas. Os gametócitos de *P. falciparum* possuem uma morfologia bem distinta e única, do tipo falciforme ou forma de banana. Os esquizontes de *P. falciparum* normalmente produzem um número alto de merozoítos,

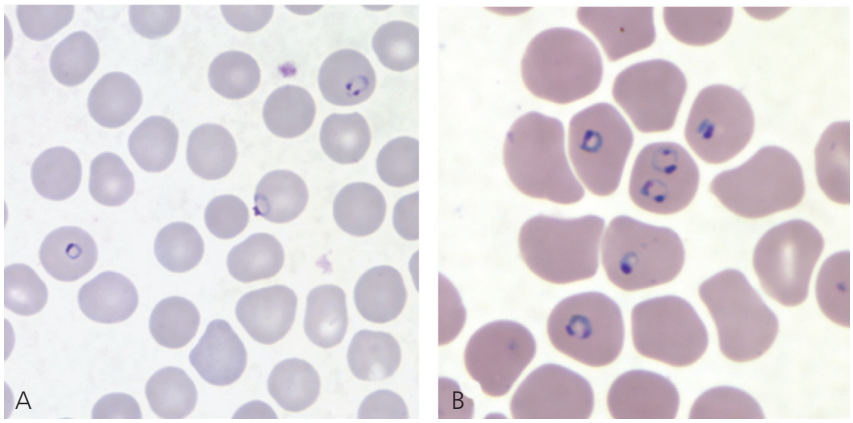


Figura 44.35 **(A** e **B)** Trofozoítos jovens de *P. falciparum* em esfregaço sanguíneo corado por coloração de Giemsa. Em **B**, notar o eritrócito contendo múltiplos trofozoítos, o que é uma característica da infecção causada por essa espécie.
Fonte: www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html.

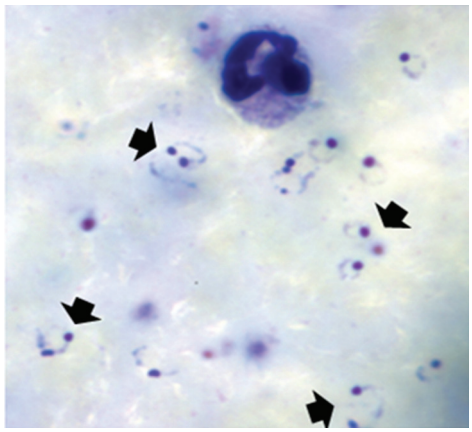


Figura 44.36 Trofozoítos jovens de *P. falciparum* em uma gota espessa corada por coloração de Giemsa. Os trofozoítos indicados pelas setas são binucleados, ou seja, apresentam duas cromatinas.
Fonte: www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html.

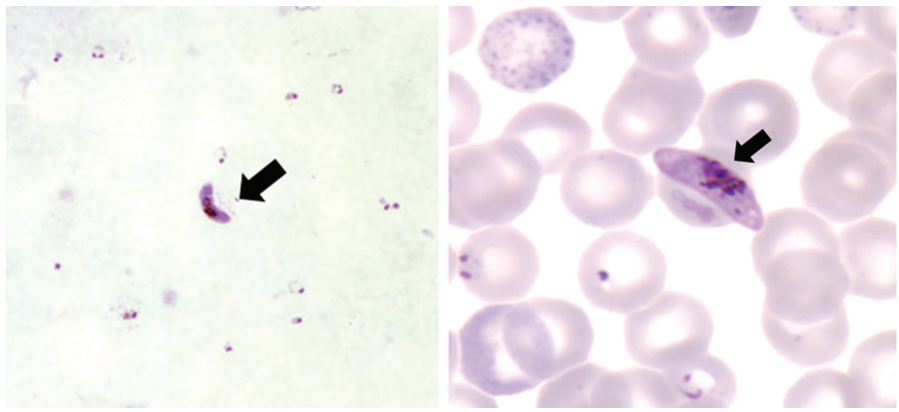


Figura 44.37 Gametócitos (seta) de *P. falciparum* em esfregaço gota espessa (imagem à direita) e esfregaço sanguíneo (imagem à esquerda), ambos corados por coloração de Giemsa. Notar a morfologia falciforme do gametócito. Nestas imagens, ainda se pode observar o "bib" que representa o restante da membrana do eritrócito infectado. As imagens também mostram formas de anéis ou trofozoítos jovens em alguns eritrócitos.
Fonte: www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html.

podendo conter em torno de 20 ou mais, com média de 16 a 18 merozoítos. As infecções causadas *por P. falciparum* normalmentre são bem sincrônicas e, por isso, não é comum observar todos os estágios nas amostras dos pacientes. Geralmente se observam trofozoítos jovens (fase aguda) e gametócitos na circulação.

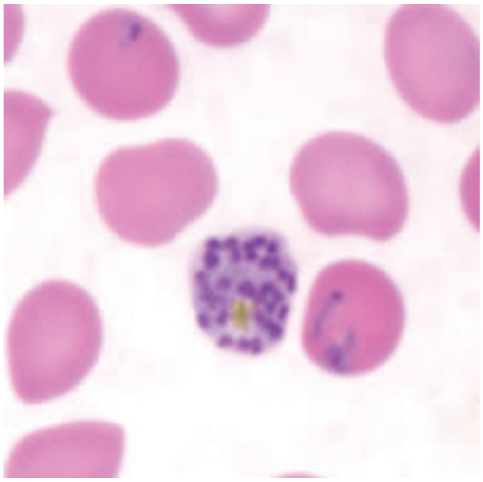


Figura 44.38 Esquizonte de *P. falciparum* em esfregaço sanguíneo corado por coloração de Giemsa.
Fonte: www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html.

Plasmodium vivax

Os trofozoítos jovens *de P. vivax* geralmente têm um citoplasma espesso com um único ponto grande de cromatina. Esses estágios podem ser confundidos com os de *P. ovale*. O citoplasma dos trofozoítos de *P. vivax* pode ser ameboide e granulações de Schüffner aparecem conforme os trofozoítos amadurecem. Os trofozoítos mais maduros de *P. vivax* serão cada vez mais ameboides contendo grandes vacúolos. Os eritrócitos infectados são visivelmente maiores do que os não infectados. As granulações de Schüffner nos eritrócitos são visíveis e vermelhas com a coloração de Giemsa. Os gametócitos de *P. vivax* são arredondados ou ovais, grandes e normalmente preenchem o citoplasma do eritrócito infectado. O citoplasma do gametócito geralmente cora-se em azul mais escuro e contém o pigmento malárico (hemozoína), que tende a ser fino e marrom. Os esquizontes de *P. vivax* são grandes e ameboides. A cromatina é disposta em duas ou mais massas, e o pigmento malárico é também geralmente disposto em mais do que uma massa. Os esquizontes maduros podem conter de 12 a 24 merozoítos, cada um dos quais contém um ponto de cromatina e uma massa de citoplasma. O número médio de merozoítos encontrados em esquizontes de *P. vivax* é de aproximadamente 12 a 18. O pigmento é normalmente organizado em um ou dois aglomerados. Como em outros estágios, os eritrócitos infectados com esquizontes são geralmente maiores que hemácias não infectadas.

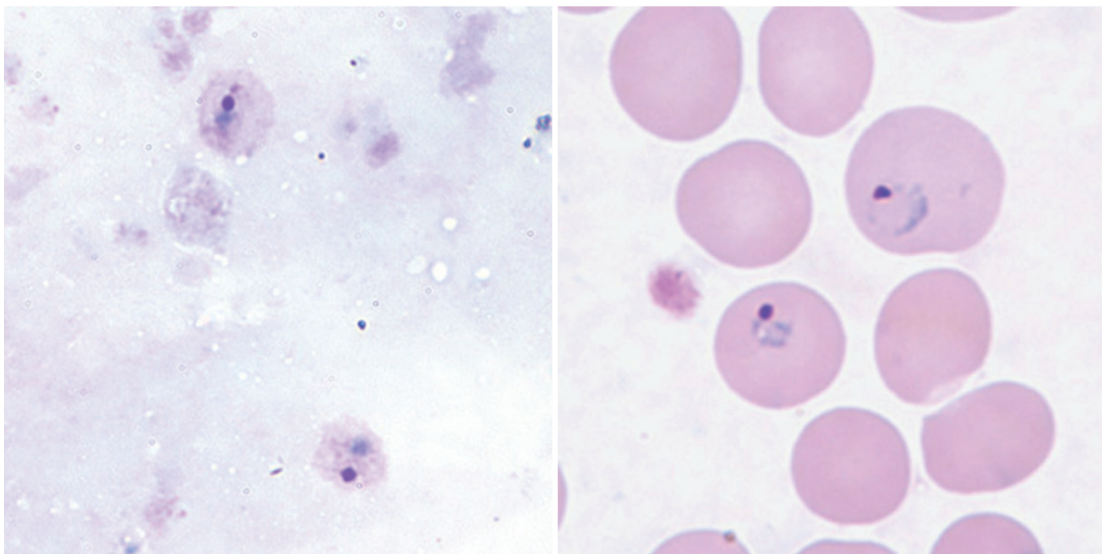


Figura 44.39 Trofozoítos jovens de *P. vivax* em uma gota espessa (imagem à esquerda) e em esfregaço sanguíneo (à direita) corados por coloração de Giemsa. Notar que o tamanho dos eritrócitos infectados é maior do que dos eritrócitos não infectados observados no campo microscópico.
Fonte: www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html.

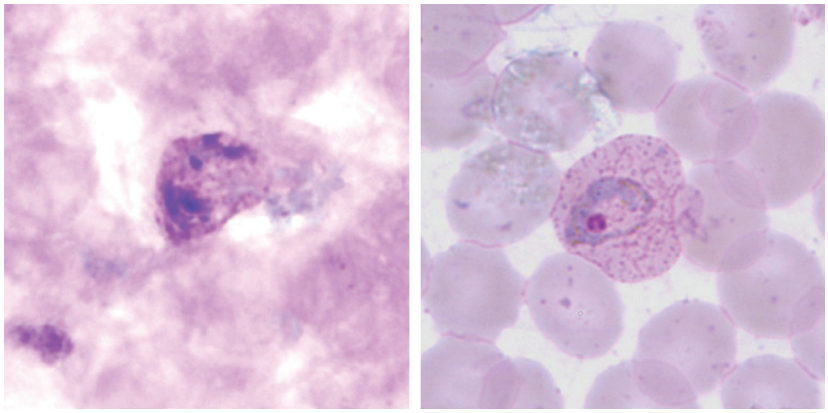


Figura 44.40 Trofozoítos maduros de *P. vivax* em uma gota espessa (à esquerda) e em esfregaço sanguíneo (à direita) corados por coloração de Giemsa. Notar as granulações de Shüffner e que o tamanho do eritrócito infectado é maior que da média dos eritrócitos não infectados observados no campo microscópico.
Fonte: www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html.

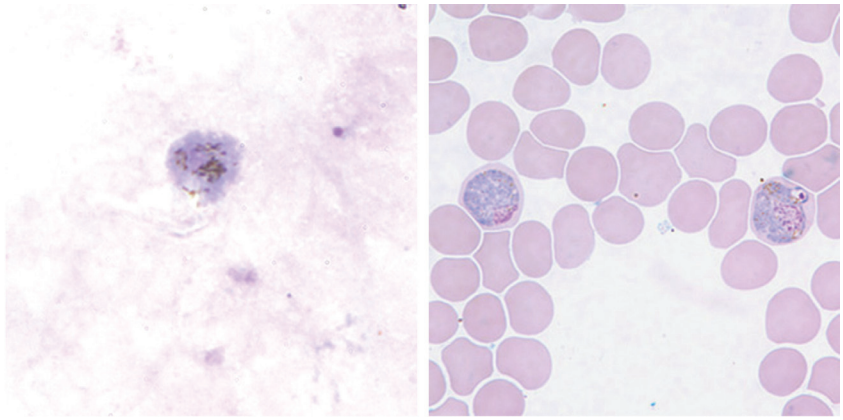


Figura 44.41 Gametócitos de *P. vivax* em uma gota espessa (à esquerda) e em esfregaço sanguíneo (à direita) corados por coloração de Giemsa. Os gametócitos são arredondados e normalmente ocupam todo o interior do eritrócito infectado.
Fonte: www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html.

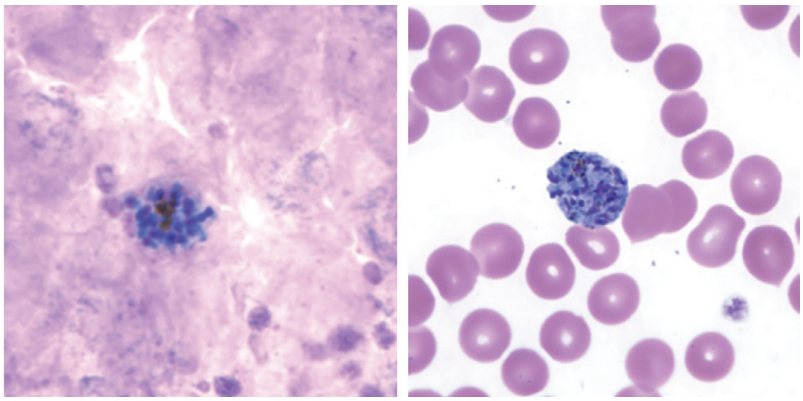


Figura 44.42 Esquizontes de *P. vivax* em uma gota espessa (à esquerda) e em esfregaço sanguíneo (à direita), ambos corados pela coloração de Giemsa.
Fonte: www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html.

Plasmodium malariae

Os trofozoítos jovens têm um (raramente dois) ponto de cromatina e um anel de citoplasma, que tende a ser mais espesso do que o de *P. falciparum*. Formas "de olho de pássaro" podem ser observadas. Não há aumento do tamanho dos eritrócitos infectados. Os trofozoítos maduros de *P. malariae* têm a cromatina arredondada ou entremeada e o citoplasma geralmente compacto. O pigmento pode ser grosseiro e periférico. No trofozoíto maduro, o citoplasma pode alongar dentro do eritrócito infectado, formando uma "banda", ou pode ser oval com um vacúolo, tomando uma forma de "cesto". A cromatina é geralmente única, às vezes menos definida ou meio espessa. A cromatina pode se tornar mais arredondada nos trofozoítos que não atingiram a maturação completa. Os esquizontes de *P. malariae* têm em torno de 6 a 12 (geralmente 8 a 10) merozoítos, muitas vezes dispostos em roseta. Os esquizontes maduros podem encher quase completamente o eritrócito infectado. O pigmento é claro e muitas vezes periférico. Esquizontes podem ser comuns na circulação de sangue periférico. Os gametócitos são redondos e ocupam a hemácia de tamanho normal.

Plasmodium ovale

Os trofozoítos jovens em forma de anel geralmente contêm um único ponto de cromatina, mas podem ser binucleados. Eritrócitos infectados contendo mais do que um trofozoíto jovem podem ser observados, tornando difícil a diferenciação dos estágios de anel do *P. ovale* e do *P. falciparum*.

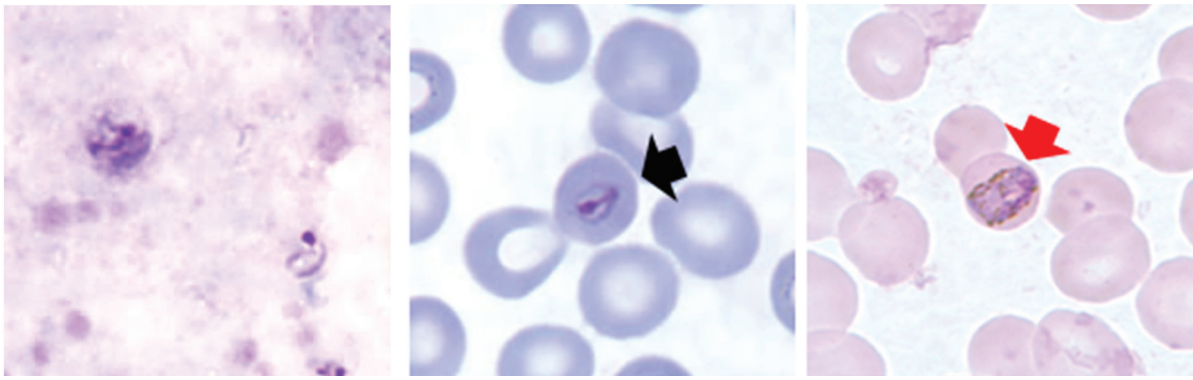


Figura 44.43 Imagem à extrema esquerda: trofozoítos maduros (alto do lado esquerdo da imagem) e trofozoítos jovens (lado direito mais abaixo) de *P. malariae* em uma gota espessa. Imagens à direita: Trofozoítos em esfregaços sanguíneos. Notar a forma conhecida como "olho de pássaro" (seta preta) e a forma de banda (seta vermelha) que são características de trofozoítos jovens e maduros de *P. malariae*, respectivamente. Na forma de "olho de pássaro", a cromatina do trofozoíto se posiciona mais central em relação ao citoplasma do parasito. Na forma de banda, o trofozoíto se alonga dentro do eritrócito infectado formando uma banda transversal. As imagens foram obtidas de esfregaço e gota espessa corados por coloração de Giemsa.

Fonte: www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html.

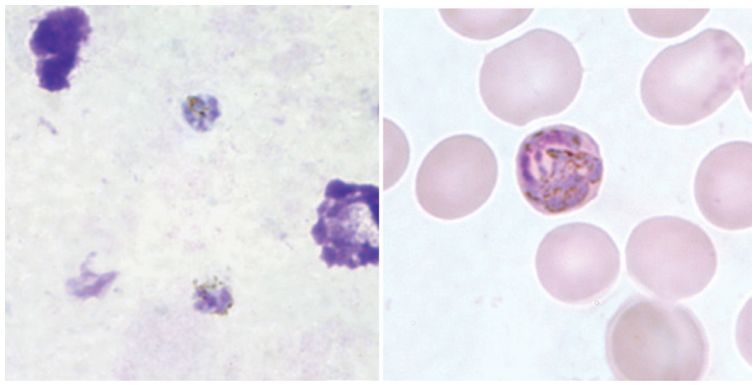


Figura 44.44 Gametócitos de *P. malariae* em gota espessa (à esquerda) e em esfregaço sanguíneo (à direita) corados por coloração de Giemsa. Notar no esfregaço que o tamanho da célula infectada é menor do que a média dos outros eritrócitos presentes no mesmo campo microscópico.

Fonte: www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html.

O citoplasma é normalmente espesso com um grande ponto de cromatina como descrito em *P. vivax*. Os trofozoítos maduros são menos ameboides do que os de *P. vivax* e podem apresentar fimbriações, que são ramificações dentilhadas nas bordas da membrana do eritrócito infectado. Também apresentam as granulações de Schüffner como descrito em *P. vivax*. Os eritrócitos infectados não são geralmente tão grandes como os observados em infecções por *P. vivax*. Os trofozoítos maduros de *P. ovale* são mais compactos, com menos vacúolos, quando comparados com o mesmo estágio do *P. vivax*. Os gametócitos são arredondados e normalmente não preenchem todo o espaço interno do eritrócito infectado. Mesmo assim, os gametócitos de *P. ovale* podem se confundir com os de *P. vivax*, embora haja geralmente menor alargamento dos eritrócitos infectados. Os esquizontes de *P. ovale* podem ser semelhantes aos de *P. vivax*, embora tenham a tendência de ser menores, contendo menos merozoítos (4 a 16, em média, 8). Esse estágio pode demonstrar alongamento para uma forma oval com fimbriações. O pigmento é menos espesso, semelhante ao observado em *P. vivax*.

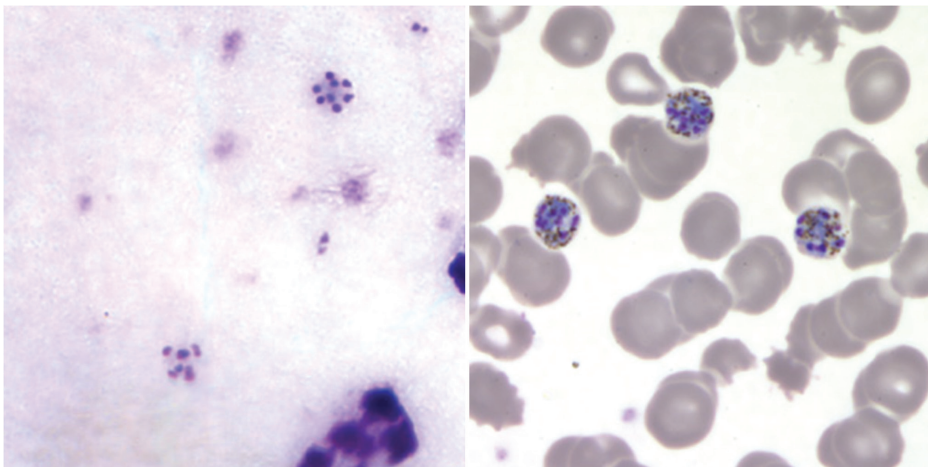


Figura 44.45 Esquizontes de *P. malariae* em uma gota espessa (à esquerda) e em esfregaço sanguíneo (à direita), ambos corados por coloração de Giemsa. Notar a forma de roseta que os esquizontes exibem, com o pigmento malárico se posicionando no centro e os merozoítos rodeando o mesmo.
Fonte: www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html.

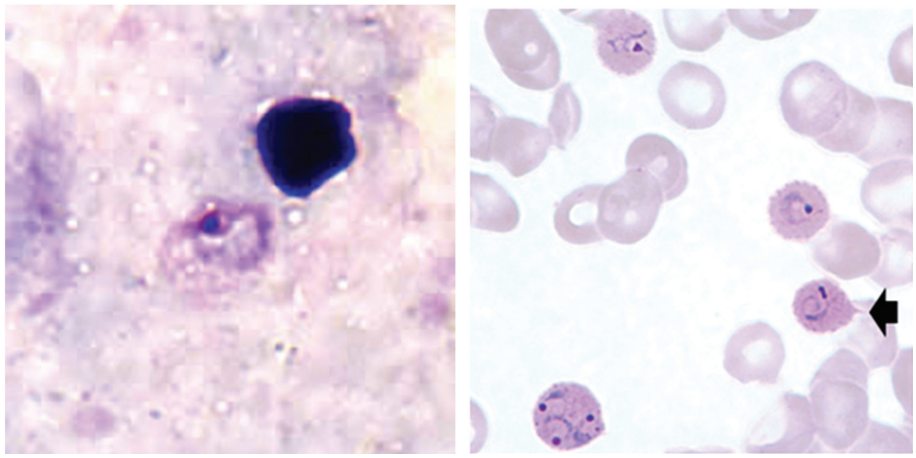


Figura 44.46 Trofozoítos de *P. ovale* em gota espessa (à esquerda) e em esfregaço sanguíneo (à direita) corado por coloração de Giemsa. Notar no esfregaço que as células infectadas mostram as granulações de Shüffner e também apresentam fimbriações (seta) que são as ramificações dentilhadas nas bordas dos eritrócitos, características morfológicas típicas de *P. ovale*. O tamanho da hemácia infectada é menor do que a média dos outros eritrócitos presentes no mesmo campo microscópico.
Fonte: www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html.

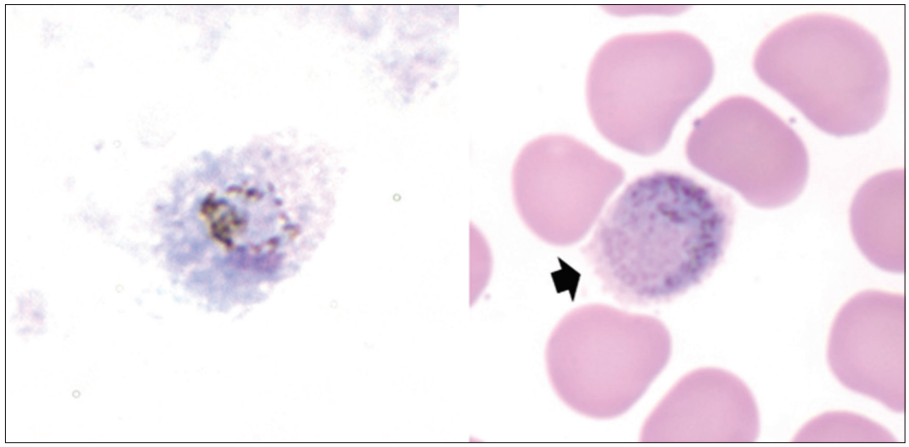


Figura 44.47 Gametócitos de *P. ovale* em gota espessa (à esquerda) e em esfregaço sanguíneo (à direita) corados por coloração de Giemsa. Notar que as células infectadas mostram as granulações de Shüffner e também apresentam fimbriações (seta), que são características morfológicas típicas de *P. ovale*.
Fonte: www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html

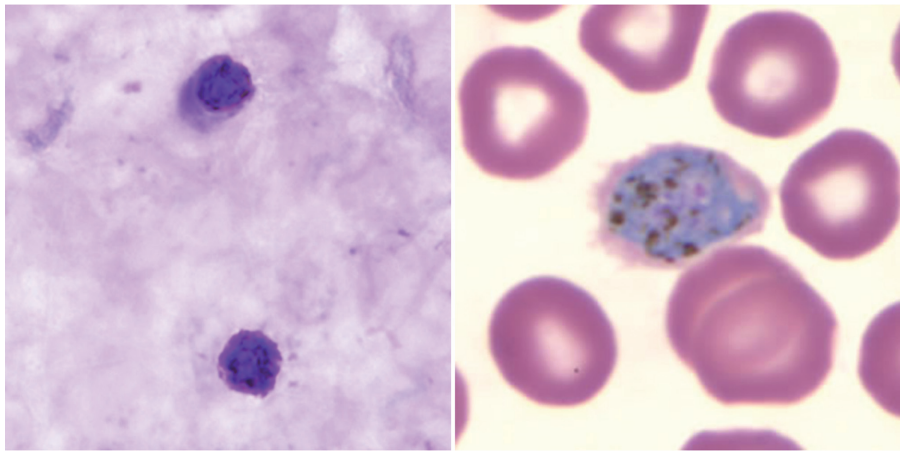


Figura 44.48 Esquizontes de *P. ovale* em gota espessa (à esquerda) e em esfregaço sanguíneo (à direita) corados por coloração de Giemsa. Observar que as células infectadas mostram as granulações de Shüffner e também apresentam fimbriações.
Fonte: www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html

Plasmodium knowlesi

Os trofozoítos jovens em forma de anel de *P. knowlesi* são semelhantes aos de *P. falciparum*, com cromatina pequena e bem definida. Formas *appliqué* podem aparecer, assim como anéis retangulares, e abrigar um ou mais pontos de cromatina. Os eritrócitos também podem conter mais do que um trofozoíto. À medida que o vacúolo é perdido durante a fase de maturação, o trofozoíto torna-se menor e mais compactado. Quando maduro, os anéis não ameboides podem ocupar metade ou mais do citoplasma do eritrócito infectado. Os trofozoítos maduros de *P. knowlesi* geralmente formam bandas muito semelhantes às observadas em *P. malariae*. O pigmento malárico (hemozoína) tem a aparência de grãos escuros. Granulações muitas vezes referidas como "pontuações de Sinton e Mulligan" podem estar presentes nos eritrócitos e são diferentes das pontuações de Schüffner observadas em *P. vivax* e *P. ovale*. Os esquizontes podem ter pontuações de Sinton e Mulligan. O núcleo dos esquizontes continuam a se dividir até que haja 16 (média de 10) merozoítos. Conforme o esquizonte amadurece, o mesmo preenche o citoplasma do eritrócito infectado e o pigmento malárico se forma em uma ou mais massas. No esquizonte maduro, os merozoítos podem aparecer segmentados e o pigmento se tornar uma massa única.

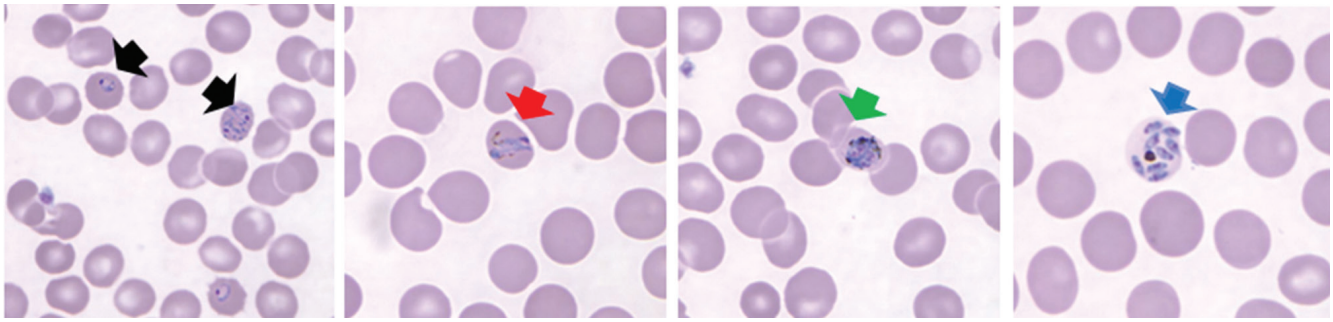


Figura 44.49 Diferentes estágios de *P. knowlesi* em um esfregaço sanguíneo corado pela coloração de Giemsa. Os estágios de trofozoítos jovens são indicados por seta preta; trofozoíto maduro é indicado por seta vermelha; o estágio de gametócito é indicado por seta verde e o estágio de esquizonte é indicado por seta azul.
Fonte: www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html

Toxoplasma gondii

Silvia Maria Spalding

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma infecção causada por *Toxoplasma gondii*, um protozoário coccídeo intracelular obrigatório, de distribuição cosmopolita. Os felídeos são os hospedeiros definitivos, enquanto o homem e outros mamíferos e aves são hospedeiros intermediários.

O toxoplasma foi isolado, primeiramente em 1908 por Nicolle e Manceaux, de um roedor africano da espécie *Ctenodactylus gundi*, da qual se originou o nome. Na mesma época, em São Paulo, Splendore isolou o mesmo agente de coelhos. A primeira descrição de infecção humana por este parasito foi feita por Jankü, em 1923, no relato de um caso em criança falecida em Praga (Cimerman e Cimerman, 2001). Torres e col., em 1927, descreveram a presença em cortes histológicos de cérebro, miocárdio e músculo esquelético de um recém-nascido falecido. No ano de 1937, ocorreu a primeira descrição da infecção congênita, por Wolf e Cohen, relatando a ocorrência em recém-nascido com encefalite, meningite e mielite (Vaz e col., 2011).

Somente após o desenvolvimento de um teste sorológico, do corante de Sabin e Feldman, em 1948, é que foi possível demonstrar a alta prevalência mundial dessa infecção, o que contribuiu imensamente para o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose, possibilitando a realização de inquéritos epidemiológicos (Neves e col., 2011).

EPIDEMIOLOGIA

A toxoplasmose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica, com predominância de soropositividade em áreas de clima quente e úmido, com prevalência variável até mesmo dentro do mesmo país ou estado. A variabilidade da frequência da infecção está ligada a diversos fatores, tais como: padrões culturais da população, hábitos alimentares, idade, procedência rural ou urbana. Cerca de 20% a 83% da população humana apresenta anticorpos anti-*T. gondii,* sob forma de infecção crônica assintomática (Montoya e Liesenfeld, 2004).

A prevalência varia com a abundância de gatos e com os hábitos alimentares, sendo que a prevalência aumenta com a idade do indivíduo, supostamente pelo maior tempo de exposição ao parasito. A prevalência de toxoplasmose em adultos varia de acordo com a idade e a população estudada; este fato ocorre pelas diferentes formas de infecção. Oocistos infectantes podem sobreviver até 18 meses em condições adversas, contaminando a água e as pastagens, disseminando, por sua vez, o parasito entre herbívoros (Vaz e col., 2011).

As cepas de *T. gondii* foram definidas, baseando-se na virulência em camundongos infectados da linhagem "Swiss", em três tipos (Grigg e col., 2001; Sibley, 2003). Cepas do tipo I são altamente patogênicas, com elevado nível de parasitemia, provocando a morte em camundongos com formação de ascite contendo taquizoítos em um tempo médio de 5 a 10 dias (Ajioka e col., 2001). A cepa tipo I mais conhecida é

a RH, que foi isolada em 1939, sob a forma de cisto do cérebro de um recém-nascido com toxoplasmose congênita que apresentava lesões cerebrais. Esta cepa até então foi considerada pouco patogênica. Após sucessivas passagens em culturas de células, os parasitos perderam a capacidade de formar cistos. Em camundongos, verificou-se a transformação em uma cepa altamente patogênica, ocasionando a morte dos animais com a presença de inúmeros taquizoítos na cavidade abdominal. Desde então, passou a ser utilizada como cepa referência do tipo I (Ajioka e col., 2001; Ajzemberg e col., 2005). Cepas do tipo II são menos patogênicas e induzem infecção crônica, produzindo cistos teciduais nos animais (Ajioka e col., 2001). Cepas do tipo III possuem patogenicidade intermediária. Induzem discreta ascite em camundongos com pouquíssimos taquizoítos e poucos cistos no cérebro (Ajioka e col., 2001). A cepa RH e aquelas cepas que são geneticamente similares a ela exibem uma dose letal de 100% (LD100) de um único parasito viável. Cepas pouco virulentas exibem uma dose letal (LD50) maior ou igual a 1.000 parasitos e facilmente estabelecem infecções crônicas em camundongos (Howe e col., 1996). As cepas com virulência intermediária podem ser cepas em transição entre os fenótipos virulentos e não virulentos (Literák e col., 1998).

As linhagens clonais identificadas por essas técnicas são dos tipos: I, II e III, e estão relacionadas ao gene SAG2 do T. gondii, sendo encontradas em cepas isoladas em humanos e animais (Fuentes e col., 2001; Vaz e col., 2010). Filogeneticamemente, os genótipos dos Tipos II e III pertencem ao mesmo grupo, contudo o genótipo do tipo II é mais prevalente em camundongos e em cepas mantidas em cultivo celular. O genótipo do tipo I está associado à toxoplasmose congênita (Fuentes e col., 2001; Ajzenberg e col., 2002; Vaz e col., 2010).

No Brasil, existem estudos que demonstram variações da prevalência da toxoplasmose na população adulta imunocompetente e na população de gestantes, assim como da relação e comparação de métodos de diagnóstico diversos (imunológicos e parasitológicos), incluindo métodos de detecção do DNA do T. gondii em amostras clínicas diversas (Ferreira, 2012).

O *T. gondii* apresenta um genoma nuclear estável possuindo aproximadamente 87 Mb. É complementado por um DNA circular extracromossomal de 35 kb no interior de uma organela denominada apicoplasto (plastídeo) e um genoma mitocondrial de 6 kb (Ajioka e col., 2001). O genoma do plastídeo de *T. gondii* foi sequenciado em 1997 (GenBank accession U87145). Estudos de hibridização *in situ* usando sondas em *T. gondii* mostraram que o genoma de 35 kb residia em uma organela localizada na região apical ao núcleo, denominada apicoplasto (Köhler e col., 1997). O genoma nuclear é haploide, contendo 8×107 pares de base, para a maioria dos estágios do ciclo de vida do parasito, exceto durante a divisão sexual que ocorre no intestino dos felídeos (Montoya e Liesenfeld, 2004).

TRANSMISSÃO

As formas infectantes do parasita são: taquizoítos, cistos contendo bradizoítos e oocistos contendo esporozoítos.

A grande dispersão do parasito pode ser determinada pela possibilidade de ele apresentar vários mecanismos de transmissão, como a ingestão de cistos contidos em carnes cruas ou mal cozidas, a ingestão de oocistos presentes nas fezes de felídeos, que podem contaminar a água e alimentos crus, e a passagem de taquizoítos por via transplacentária. De modo geral, o feto pode ser infectado quando a mulher contrai a primoinfecção durante a gestação (Spalding e col., 2002).

A ingestão, sem prévio cozimento, de linguiças, de carne suína crua, de embutidos crus, provavelmente devam ser os responsáveis pela alta prevalência da toxoplasmose em algumas regiões.

A diversidade dos fatores envolvidos na transmissão do parasito pode ser a causa das altas prevalências de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em grupos humanos com hábitos e etnias bem diferentes, sendo dependente do grau e da frequência de exposição aos referidos fatores (Spalding e col., 2002).

CICLO DE VIDA

O ciclo do parasito é dividido em duas fases: fase assexuada (extraintestinal), que ocorre nos hospedeiros intermediários e definitivos, e fase sexuada (isosporiana ou entérica), que ocorre somente nos felídeos.

O *T. gondii* é um protozoário heteroxênico facultativo, intracelular obrigatório, que, durante a fase aguda da infecção, multiplica-se rapidamente como taquizoíto, havendo a invasão, reprodução assexuada do parasito e lise da célula hospedeira. Todas as células nucleadas são suscetíveis à invasão pelos taquizoítos. Na fase crônica, o protozoário se diferencia em formas de crescimento lento, os bradizoítos, e originam os cistos intracelulares. A ruptura de alguns cistos maduros libera os bradizoítos, que voltam a infectar novas células hospedeiras. Apesar da presença de cistos em nível tecidual, eles causam baixa resposta celular, e a infecção crônica persiste por toda a vida do hospedeiro sem causar patologia significativa.

Após a fase de reprodução esquizogônica nas células epiteliais dos gatos, os parasitos diferenciam-se em gametócitos. Todos os estágios de replicação do *Toxoplasma* são haploides, incluindo os gametócitos, sendo o zigoto o único estágio diploide. Os gametócitos evoluem para gametas masculinos e femininos. Após a fusão dos gametas, o zigoto desenvolve uma parede cística, dando origem ao oocisto, que é liberado nas fezes ainda imaturo. No meio ambiente, evolui e se torna infectante, apresentando, então, dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos haploides. Os oocistos são extremamente resistentes às condições de umidade e temperatura do meio ambiente e sua disseminação ocasiona uma alta prevalência de infecção entre os animais herbívoros.

O taquizoíto, de alta capacidade de reprodução e de invasão, infecta inclusive células leucocitárias presentes na circulação sanguínea e em outros fluidos biológicos. Sob outra forma, o bradizoíto, forma cistos nos tecidos do sistema nervoso e em outros órgãos e, raras vezes, são detectados no sangue ou outros fluidos corporais.

PATOGENIA E ASPECTOS CLÍNICOS

A toxoplasmose, de acordo com a transmissão e a clínica, pode ser classificada em duas formas: a) congênita, que ocorre *in utero*, quando a gestante se encontra na fase aguda da infecção; b) adquirida, que ocorre após o nascimento (Remington e col., 2004).

Em indivíduos imunocompetentes, geralmente a toxoplasmose adquirida se apresenta de forma assintomática ou subclínica, podendo ocorrer quadros de sintomatologia variável que duram de semanas a meses, caracterizados por linfoadenopatia, sensação de fadiga, mialgia, cefaleia e anorexia. Em alguns indivíduos, pode ocorrer retinocoroidite ou, mais raramente, exantema generalizado (Remington e col., 2004).

Os casos mais graves, com alta morbidade e mortalidade, ocorrem em indivíduos imunocomprometidos, transplantados ou portadores de HIV, ou em infecções congênitas, podendo causar aborto, natimorto ou morte neonatal e sequelas graves em neonatos, principalmente se a infecção ocorrer nos dois primeiros trimestres da gestação (Remington e col., 2004).

No caso da toxoplasmose congênita (TC), a gravidade das lesões depende do período gestacional em que ocorreu a infecção. Quando a contaminação acontecer no primeiro trimestre da gestação, o risco de contaminação fetal é baixo, mas as lesões são maiores, levando à morte do feto ou à formação de focos necróticos, responsáveis por sequelas importantes. No segundo trimestre de gestação, a contaminação é mais frequente, mas as lesões são menos graves, contudo pode ocorrer aborto espontâneo em 25% dos casos ou doença grave. No terceiro trimestre geralmente ocorre doença subclínica (Remington e col., 2004).

Em função da variedade fisiopatológica e clínica da infecção toxoplásmica, as modalidades de diagnóstico são diferenciadas, podendo estar relacionadas a uma reativação em indivíduos imunodeprimidos, a uma infecção neonatal ou a uma infecção primária (Spalding e col., 2005).

A infecção aguda em gestantes pode estar associada a lesões fetais, que podem variar de formas subclínicas, morte intrauterina ou danos no sistema nervoso central (SNC), como calcificações cerebrais, hidrocefalia, microcefalia e coriorretinite. O recém-nato frequentemente pode apresentar baixo peso, hepato e esplenomegalia, quadros de anemia, presença de plaquetopenia e danos oculares resultantes de processos inflamatórios da retina. Crianças aparentemente normais ao nascer podem subsequentemente desenvolver injúrias associadas à toxoplasmose (Remington e col., 2004).

A encefalite toxoplásmica é a infecção oportunista mais frequente do sistema nervoso central em pacientes com AIDS. Ocorre em 5% a 15% dos pacientes e representa 40% de todas as doenças neurológicas. No Brasil, o parasito é o principal agente causador de lesão encefálica associada a AIDS, sendo responsável por cerca de 50% dos casos (Remington e col., 2004).

A toxoplasmose ocular é caracterizada pela retinocoroidite, lesão mais frequentemente associada à protozoose, com 30% a 50% dos casos atribuídos ao *T. gondii* (Spalding e col., 2002).

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico clínico da toxoplasmose, na maioria das vezes, não é possível, pois os sinais e sintomas da protozoose são apenas sugestivos, tornando-se necessária a utilização de métodos de diagnóstico laboratorial.

O diagnóstico pré-natal da infecção por *T. gondii* é importante, principalmente em casos em que a mulher apresenta a infecção aguda durante a gestação. A detecção do parasito no sangue fetal ou no líquido amniótico confirma a infecção fetal sugerida em outros procedimentos como a ultrassonografia e a amniocentese. A identificação do parasito pode ser realizada por inoculação do material clínico em animais, como citado acima, ou por detecção do DNA do parasito por técnicas moleculares ou, ainda, por meio de provas sorológicas que detectem IgM ou títulos de IgG em elevação.

No diagnóstico de toxoplasmose em indivíduos imunossuprimidos pelo vírus HIV são utilizados testes sorológicos (IgG anti-*T. gondii*), cultivo celular ou a PCR na detecção do parasito em líquido cefalorraquidiano. A tomografia computadorizada é indicada nos casos de suspeita de lesões cerebrais causadas pelo protozoário.

Parasitológico

O diagnóstico parasitológico consiste na demonstração do protozoário em amostras de tecidos, de biópsia, líquido amniótico, placenta, líquido cefalorraquideano (LCR), sangue, na fase aguda da infecção, ou em suspensão de cultivo celular. O parasito pode ser observado nas formas de taquizoítos ou bradizoítos. Este método pode ser empregado em especial quando os diagnósticos sorológicos não apontam dados conclusivos (Neves e col., 2011).

O isolamento do parasito é realizado através de inoculação intraperitonial do material suspeito em animais de laboratório, como camundongos ou em cultivo celular *in vitro* (Spalding e col., 2002, 2005).

Imunológico

Usualmente o diagnóstico laboratorial é baseado em testes sorológicos com a detecção de imunoglobulinas das classes IgG e IgM anti-*T. gondii*.

Em infecções humanas, a imunoglobulina da classe IgM é a primeira a ser detectada. Os anticorpos do tipo IgG aparecem mais tarde, e seus níveis decrescem gradualmente, persistindo com títulos baixos por um longo tempo da vida do hospedeiro. Entretanto, o aumento da sensibilidade na detecção de anticorpos IgM faz com que estes anticorpos sejam detectados por períodos mais longos, após a fase aguda da infecção, diminuindo o seu valor no diagnóstico laboratorial (Remington e col., 2004).

Os exames sorológicos que detectam anticorpos IgM auxiliam o diagnóstico de toxoplasmose aguda. Já o teste de avidez para anticorpos IgG permite distinguir a infecção recente da antiga. A existência de anticorpos IgG de alta avidez em paciente com IgM reagente sugerem que a infecção foi contraída há mais de quatro meses. A identificação precoce da toxoplasmose é imprescindível em gestantes. Embora,

normalmente, os recém-nascidos infectados sejam assintomáticos, podem apresentar sequelas após o nascimento, como a coriorretinite e o retardo mental (Remington e col., 2004).

Métodos imunoenzimáticos permitem avaliar o perfil imune da gestante e estabelecer o risco da infecção conforme a idade gestacional e possibilitam a inclusão da gestante em protocolos terapêuticos que visam inibir a parasitemia (Pinon e col., 2001; Remington e col., 2004).

Molecular

O diagnóstico molecular é uma importante ferramenta no diagnóstico direto da toxoplasmose, pois permite a detecção do parasito em um intervalo de tempo relativamente curto, e pode apresentar elevada sensibilidade e especificidade (Ferreira, 2012).

A PCR qualitativa para o gene B1 (repetido 35 vezes no genoma do *T. gondii*) pode ser utilizada para avaliar a eficácia do tratamento em amostras clínicas como: líquido amniótico, sangue de cordão, placenta, humor aquoso e em tecidos diversos infectados pelo T. gondii (Spalding e col., 2002; Remington e col., 2004).

As técnicas moleculares baseiam-se na PCR e na hibridização por *dot blot* do DNA extraído da amostra do paciente, com uma sonda específica de *T. gondii* (Ferreira, 2012).

A técnica de PCR pode detectar DNA de 1 a 10 parasitos e o resultado pode ser obtido em vinte e quatro horas. Essa técnica é muito útil no diagnóstico pré-natal, identificando a infecção congênita, através de líquido amniótico. O parasito *T. gondii* é detectado por PCR em amostras de sangue, líquido cefalorraquidiano e placenta (Spalding e col. 2005; Ferreira, 2012).

A técnica de PCR *Real time* apresenta como vantagem a quantificação, conforme o seu aparecimento, e pode ser utilizada no acompanhamento do tratamento (Ferreira, 2012).

A sensibilidade da técnica de PCR normalmente aumenta quando é utilizada como alvo uma sequência repetitiva no genoma do parasito. O gene B1 é um dos mais empregados nas metodologias de PCR por ser altamente conservado e repetitivo. Além desse gene, também tem sido descrito o gene P30 (que codifica a proteína SAG1) e a região que codifica o RNA ribossomal que está presente no genoma em 110 cópias (Ferreira, 2012).

O LCR tem sido utilizado no diagnóstico da infecção toxoplásmica reativada nos pacientes HIV positivos com encefalite toxoplásmica (ET). Na toxoplasmose pulmonar, uma grave infecção oportunista em pacientes HIV positivos, o diagnóstico por PCR pode ser realizado com amostras de lavados broncoalveolares. Este procedimento tem mostrado uma sensibilidade similar ao dos métodos convencionais de detecção direta de *T. gondii* (Ferreira, 2012).

O diagnóstico molecular de toxoplasmose ocular a partir do humor aquoso ou tecido parafinado tem sido relatado e tem-se mostrado bastante eficiente na detecção de DNA do *T. gondii*. Entretanto, a utilização desse tipo de amostra clínica não é adequada para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii*. A combinação de ambos os métodos pode qualificar consideravelmente o diagnóstico (Ferreira, 2012).

A caracterização molecular das cepas de Toxoplasma gondii por técnicas como análises isoenzimáticas, polimorfismo de fragmentos de DNA por restrição enzimática (RFLP-PCR), sequenciamento automatizado, DNA polimórfico amplificado de forma randômica (RAPD) permite estabelecer uma relação entre o genótipo e virulência da cepa isolada, além da correlação das cepas e refratariedade às drogas utilizadas no tratamento da infecção (Cristina e col., 1995; Guo e Johnson, 1995; Howe e col., 1997; Dardé, 2004).

Nos últimos anos, há um consenso entre os pesquisadores de que a detecção de DNA de parasito deveria ser realizada por meio de, no mínimo, dois ensaios diferentes que apresentem resultados concordantes e/ou por dois ou três resultados positivos empregando os mesmos oligonucleotídeos.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Aarnaes SL, Blanding J, Speier S, et al. Comparison of the ProSpecT and Color Vue en-zyme-linked immunoassays for the detection of Cryptosporidium in stool specimens. Diagn Microbiol Infect Dis. 1994;19:221.
2. Abanyie F, Harvey RR, Harris J, et al. Multistate Outbreaks of Cyclospora cayetanensis Infections Associated with Fresh Produce: Focus on the Texas Investigations. Epidemiol Infect. 2015;13:1-8.
3. Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. Toxoplasma gondii genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. Expert Rev Mol Med. 2001;3:1-19.
4. Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, et al. Genotype of 86 Toxoplasma gondii Isolates As-sociated with Human Congenital Toxoplasmosis, and Correlation with Clinical Find-ings. J Infect Dis. 2002;186(5):684-9.
5. Ajzenberg D, Dumetre A, Darde ML. Multiplex PCR for typing strains of Toxoplasma gondii. J Clin Microbiol. 2005;43:1940-3.
6. Akhoundi B, Mohebali M, Shojaee S, et al. Rapid detection of human, canine visceral leish-maniasis: assessment of a latex agglutination test based on the A2 antigen from amastigote forms of Leishmania infantum. Exp Parasitol. 2013;133(3):307-13.
7. Alexeleff A. Sur la nature des formations dites "Kystes de Trichomonas intestinalis". CRSoc Bi. 1911;71:296-8.
8. Ali IKM, Clark CG, Petri Jr WA. Molecular epidemiology of amebiasis. Infect Gen Evol. 2008;8:698-707.
9. Ali SA, Hill DR. Giardia intestinalis. Curr Opin Infect Dis. 2003;16(5):453-60.
10. Almeida JC, Martins FD, Ferreira Neto JM, et al. Occurrence of Cryptosporidium spp. and Giardia spp. in a public water-treatment system, Parana, Southern Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2015;24(3):303-8.
11. Andrade SG. Morphological and behavioural characterization of Trypanosoma cruzi strains. Rev Soc Bras Med Trop. 1985;18(Supl):39-46.
12. Andreadou M, Liandris E, Kasampalidis IN, et al. Evaluation of the performance of selected in-house and commercially available PCR and real-time PCR assays for the detection of Leish-mania DNA in canine clinical samples. Exp Parasitol. 2012;131(4):419-24.
13. Antinori S, Calattini S, Longhi E, et al. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a

single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. Clin Infect Dis. 2007 Jun 44(12):1602-10.
14. Araujo AB, Berne ME. Conventional serological performance in diagnosis of Chagas' disease in southern Brazil. Braz J Infect Dis. 2013;17(2):174-8.
15. Artan R, Yilmaz A, Akcam M, et al. Liver biopsy in the diagnosis of visceral leishmaniasis. J Gas-troenterol Hepatol. 2006 Jan:21(1):299-302.
16. Ashford RW. Occurrence of an undescribed coccidian in man in Papua New Guinea. Ann Trop Med Parasitol. 1979;73:497-500.
17. Assis DC, Resende DV, Cabrine-Santos M, et al. Prevalence and genetic characteriza-tion of Cryptosporidium spp. and Cystoisospora belli in HIV-infected patients. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2013;55(3):149-54.
18. Attar ZJ, Chance ML, El-Safi S, et al. Latex agglutination test for the detection urinary antigens in visceral leishmaniasis. Acta Tropica. 2001 Jan;78(1):11-16.
19. Attar ZJ, Chance ML, El-Safi S, et al. Latex agglutination test for the detection of urinary anti-gens in visceral leishmaniasis. Acta Trop. 2001;78:11-6.
20. Attar ZJ, Chance ML, El-Safi S, et al. Latex agglutination test for the detection of urinary anti-gens in visceral leishmaniasis. Acta Trop. 2001;78:11-6.
21. Attar ZJ, Chance ML, El-Safi S, et al. Latex agglutination test for the detection of urinary anti-gens in visceral leishmaniasis. Acta Trop. 2001;78:11-6.
22. Baig AM. Pathogenesis of amoebic encephalitis: Are the amoebae being credited to an 'inside job' done by the host immune response? Acta Trop. 2015;148:72-6.
23. Ballweber LR, Xiao L, Bowman DD, et al. Giardiasis in dogs and cats: update on epide-miology and public health significance. Trends Parasitol. 2010;26(4):180-9.
24. Bandyopadhyay K, Kellar KL, Moura I, et al. A rapid microsphere assay for identifica-tion of Cryptosporidium hominis and Cryptosporidium parvum in stool and environ-mental samples. J Clin Microbiol. 2007;45:2835-40.
25. Barbosa-Ferreira JM. Acometimento cardíaco em Casos de Doença de Chagas Agu-da da Amazônia. Arq Bras Cardiol. 2010;94(6):147-9. Cad Saude Publ. 2010;23(1):13-22.
26. Bart A, Wentink-Bonnema EMS, Gilis H, et al. Diagnosis and subtype analysis of Blasto-cystis sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. BMC Infect Dis. 2013;13:389.
27. Bartelt LA, Sartor RB. Advances in understanding Giardia: determinants and mecha-nisms of chronic sequelae. F1000Prime Rep. 2015;7:62.
28. Bern C, Hernandez B, Lopez MB, et al. Epidemiologic studies of Cyclospora cayetanen-sis in Guatemala. Emerging Infect Dis. 1999;5(6):766-74.
29. Boelaert M, Rijal S, Regmi S, et al. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2004;70(1):72-7.
30. Brasil. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38(III):1-29.
31. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. 2.ed. 2009. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_diagnostico_laboratorial_malaria_2ed.pdf
32. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Nº 158, 04 de fevereiro de 2016. DOU de 05/02/2016. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos, 2016.
33. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, DF. 2016. Malária. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: www.saude.gov.br/malaria
34. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Guia de consul-ta rápida para profissionais de saúde. Brasília: MS, 2009.
35. Brumpt E. Blastocystis hominis n. species. et forms voisines. Bull Soc Pathol Exot. 1912;5:725-30.
36. Buret AG. Pathophysiology of enteric infections with Giardia duodenalis. Parasite. 2008;15(3):261-5.
37. Buss SN, Alter R, Iwen PC, et al. Implications of Culture--Independent Panel-Based De-tection of Cyclospora cayetanensis. J Clin Microbiol. 2013;51(11):3909.
38. Cabrine-Santos M, Cintra EN, Carmo RA, et al. Occurrence of Blastocystis spp. in Uber-aba, Minas Gerais, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2015;57(3):211-4.
39. Cama VA, Mathison BA. Infections by Intestinal Coccidia and Giardia duodenalis. Clin Lab Med. 2015;35(2):423-44.
40. Capewell LG, Harris AM, Yoder JS, et al. Diagnosis, Clinical Course, and Treatment of Primary Amoebic Meningoencephalitis in the United States, 1937-2013. J Pediatric Infect Dis Soc. 2015;4(4):e68-75.
41. Carvalho SF, Lemos EM, Corey R, et al. Performance of recombinant K39 antigen in the diag-nosis of Brazilian visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2003 Mar;68(3):321-4.
42. Castrillon JC, Orozco LP. [Acanthamoeba spp. as opportunistic pathogens parasites]. Rev Chilena Infectol. 2013;30(2):147-55.
43. Cavalcanti ATAE, Medeiros Z, Lopes F, et al. Diagnosing visceral leishmaniasis and HIV/AIDS coinfection: a case study in Pernambuco, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo. 2012 Fev 54(1):43-7.
44. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013. Chilomastix mesnili. [Inter-net] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.cdc.gov/dpdx/chilomastix/index.html
45. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013. Cryptosporidiosis. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html
46. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013. Cystoisosporiasis. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.cdc.gov/dpdx/cystoisosporiasis/dx.html
47. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013. Intestinal Amebae. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.cdc.gov/dpdx/intestinalAmebae/index.html
48. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013. Malária. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html
49. Centers for Disease Control and Prevention (US). 2013. Blastocystis hominis. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Blastocystis.htm
50. Centers for Disease Control and Prevention (US). 2013. Giardiasis. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html
51. Chappuis F, Rijal S, Soto A, et al. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. BMJ. 2006 Out:333(7571):723.
52. Checkley W, White AC Jr, Jaganath D, et al. A review of the global burden, novel diag-nostics, therapeutics, and vaccine targets for Cryptosporidium. Lancet Infect Dis. 2015 Jan;15(1):85-94.
53. Cimerman B, Cimerman S. Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais. 2.ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2001. p.402.

54. Colombo FA, Odorizzi RM, Laurenti MD, et al. Detection of Leishmania (Leishmania) infantum RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. Parasitol Res. 2011;109:267-74.
55. Corsaro D, Walochnik J, Kohsler M, et al. Acanthamoeba misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for Acanthamoeba miche-li sp. nov. (genotype T19). Parasitol Res. 2015;114(7):2481-90.
56. Costa AO, Gomes MA, Rocha OA, et al. Pathogenicity of Entamoeba dispar under xenic and monoxenic cultivation compared to a virulent E. histolytica. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2006;48:245-50.
57. Cota GF, de Sousa MR, Demarqui FN, et al. The Diagnostic Accuracy of Serologic and Molecu-lar Methods for Detecting Visceral Leishmaniasis in HIV Infected Patients: Meta-Analysis. PLoS Neg Trop Dis. 2012 Mai;6(5):e1665.
58. Coyle CM, Varughese J, Weiss LM, et al. Blastocystis: To Treat or Not to Treat… Clin Infect Dis. 2012;54(1):105-10.
59. Cristina N, Dardé ML, Boudin C, et al. A DNA fingerprinting method for individual characterization of Toxoplasma gondii strains: combination with isoenzymatic char-acters for determination of linkage groups. Parasitol. 1995;81(1):32-3.
60. Da Silva AJ, Bornay-Linares FJ, Moura IN, et al. Fast and reliable extraction of protozo-an parasite DNA from fecal specimens. Mol Diagn. 1999;4:57-64.
61. Dagan R, Fraser D, El-On J, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for the detec-tion of Cryptosporidium spp. in stool specimens from infants and young children in field studies. Am J Trop Med Hyg. 1995;52:134.
62. Dardé ML. Genetic analysis of the diversity in Toxoplasma gondii. Ann Ist Super Sa-nita. 2004;40(1):57-63.
63. David EB, Guimarães S, Oliveira AP, et al. Molecular characterization of intestinal pro-tozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. Parasit Vectors. 2015;8:103.
64. De Almeida BR, Santiliano FC. Levantamento dos métodos de diagnóstico para a doença de Chagas. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer. 2012;8(14).
65. de Almeida ME, Steurer FJ, Koru O, et al. Identification of Leishmania spp. by Molecular Am-plification and DNA Sequencing Analysis of a Fragment of Rrna Internal Transcribed Spacer. J Clin Microbiol. 2011;49(9):3143-9.
66. De Carli GA, Moura, H, Tasca T. Métodos de coloração para coccídios intestinais. In: De Carli GA. Parasitologia Clínica. Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2011. p.215-63.
67. De Carli GA, Tasca T. Exame de Outros Espécimes do Trato Intestinal e Sistema Uroge-nital. In: De Carli GA. Parasitologia Clínica. Seleção de Métodos e Técnicas de Labora-tório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2007.
68. De Carli GA. Parasitologia Clínica. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.
69. De Jonckheere JF. What do we know by now about the genus Naegleria? Exp Parasitol. 2014;145 Suppl:S2-9.
70. De Lana M, Tafuri WL. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. In: Neves DP. Para-sitologia Humana. 12.ed. São Paulo: Atheneu, 2011. p.89-114.
71. De Vries PJ, van der Meide WF, Godfried MH, et al. Quantification of the response to miltefosine treatment for visceral leishmaniasis by QT-NASBA. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006;100(12):1183-6.
72. Del Olmo ML, de Fuente RA, Velayos JB, et al. Visceral leishmaniasis diagnosed by duodenal biopsy. Rev Espanhola Enferm Digestivas. 2009;(101):439-40.
73. Diro E, Techane Y, Tefera T. Field evaluation of FDDATrK39 dipstick and KATEX (urine latex agglutination) for diagnosis of visceral leishmaniasis in northwest Ethiopia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007 Set:101(9):908-14.
74. Domeika M, Zhurauskaya L, Savicheva A, et al. Eastern European Network for Sexual and Reproductive Health. Guidelines for the laboratory diagnosis of trichomoniasis in East European countries. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2010;24:1125-34.
75. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, et al. Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of Trypanosoma cruzi Satellite DNA in Blood Samples. PLOS Negl Trop Dis. 2013;7(1):e2000.
76. Eberhard ML, da Silva AJ, Lilley BG, et al. Morphological and molecular characteriza-tion of new Cyclospora species from Ethiopian monkeys: C. cercopitheci sp.n., C. colobi sp.n., and C. papioni sp.n. Emerging Infect Dis. 1999;5(5):651-8.
77. Eberhard ML, Ortega YR, Hanes DE, et al. Attempts to establish experimental Cyclo-spora cayetanensis infection in laboratory animals. J Parasitol. 2000;86(3):577-82.
78. Eberhard ML, Pieniazek NJ. Laboratory diagnosis of Cyclospora infections. Arch Pathol Lab Med. 1997;121(8):792-7.
79. El Safadi D, Gaayeb L, Meloni D, et al. Children of Senegal River Basin show the high-est prevalence of Blastocystis sp. Ever observed worldwide. BMC Infect Dis. 2014;14:164.
80. Ennis JG, Teal AE, Habura A, et al. Simian Malaria in a U.S. Traveler --- New York, 2008. MMWR. 2009;58(09):229-32.
81. Esther B, Abedelmajeed N, Flory J, et al. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutane-ous Leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2006;44(4):1435-9.
82. Fakhar M, Motazedian MH, Hatam GR, et al. Comparative performance of direct agglutination test indirect immunofluorescent antibody test polymerase chain reaction, bone marrow aspi-ration method for diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. African J Microbiol. 2012 Jul:6(28):5777-81.
83. Ferreira IMR. Genotipagem de cepas polimórficas de Toxoplasma gondii provenien-tes de pacientes com toxoplasmose. São Paulo, 2012
84. Fotedar R, Stark D, Beebe N, et al. Laboratory Diagnostic Techniques for Entamoeba Species. Clin Microbiol Rev. 2007;20:511-32.
85. Frade AF, Luquetti AO, Prata A, et al. Western blotting method (TESAcruzi) as a sup-plemental test for confirming the presence of anti-Trypanosoma cruzi antibodies in finger prick blood samples from children aged 0-5 years in Brazil. Acta Tropica. 2011;117:10-3.
86. Fregonesi BM, Suzuki MN, Machado CS, et al. Emergent and re-emergent parasites in HIV-infected children: immunological and socio-environmental conditions that are in-volved in the transmission of Giardia spp. and Cryptosporidium spp. Rev Soc Bras Med Trop. 2015;48(6):753-8.
87. Frenkel JK, Silva MBO, Saldanha JC, et al. Presença extra-intestinal de cistos unizóicos de Isospora belli em paciente com SIDA. Relato de caso. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(3):409-12.
88. Fuentes I, Rubio JM, Ramirez C, et al. Genotypic Characterization of Toxoplasma gondii Strains Associated with Human

Toxoplasmosis in Spain: Direct Analysis from Clinical Samples. J Clin Microbiol. 2001;39(4):1566-70.
89. Furuchó CR, Umezawa ES, Almeida I, et al Inconclusive results in conventional sero-logical screening for Chagas' disease in blood banks: evaluation of cellular and hu-moral response. Trop Med Int Health. 2008;13(12):1527-33.
90. Gallegos L, González A, López-Urbina T, et al. Comparación de La eficacia de tres me-dios de cultivo in vitro para el desarrollo de Blastocystis spp. Rev Inv Vet Perú. 2013;24(4):480-8.
91. Garcia LS, Shum AC, Bruckner DA. Evaluation of a new monoclonal antibody combina-tion reagent for the direct fluorescent detection of Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts in human fecal specimens. J Clin Microbiol. 1992;30:3255.
92. Gilber SR, Alban SM, Gobor L, et al. Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of Trypanosoma cruzi infection. Rev Soc Bras Med Trop. 2013;46(3):310-5.
93. Gomes TS, Garcia MC, Cunha FS, et al. Differential Diagnosis of Entamoeba spp. In: Clinical Stool Samples Using SYBR Green Real-Time Polymerase Chain Reaction. Sci World J. 2014;2014:1-8.
94. Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Lucientes J, et al. Modified direct agglutination test for simplified serologic diagnosis of leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Set10(5):967-968.
95. Gonçalves EM, da Silva AJ, Eduardo MB, et al. Multilocus genotyping of Cryptosporidi-um hominis associated with diarrhea outbreak in a day care unit in Sao Paulo. Clinics. 2006;61:119-26.
96. Gonçalves SC, Régis-da-Silva CG, Brito MEF, et al. Application of the mammalian glyceralde-hyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diag-nosis of leishmaniasis. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2012;18(2):188-97.
97. Grace E, Asbill S, Virga K. Naegleria fowleri: pathogenesis, diagnosis, and treatment options. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(11):6677-81.
98. Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, et al. Sucess and virulence in Toxoplasma as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. Science. 2001;294:161-5.
99. Guo ZG, Johnson AM. Genetic characterization of Toxoplasma gondii strain by ran-dom amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. Parasitol. 1995;111(II):127-32.
100. Guzmán-Silva MA, Santos HL, Peralta RHS, et al. Experimental amoebic liver abscesso in hamsters caused by trophozoites of a Brazilian strain of Entamoeba dispar. Exp Pa-rasitol. 2013;134:39-47.
101. Haque R, Kabir M, Noor Z, et al. Diagnosis of Amebic Liver Abscess and Amebic Colitis by Detection of Entamoeba histolytica DNA in Blood, Urine, and Saliva by a Real-Time PCR Assay. J Clin Microbiol. 2010;48(8):2798-801.
102. Heggie TW. Swimming with death: Naegleria fowleri infections in recreational waters. Travel Med Infect Dis. 2010;8(4):201-6.
103. Herwaldt BL. Cyclospora cayetanensis: a review, focusing on the outbreaks of cyclo-sporiasis in the 1990s. Clin Infect Dis. 2000;31:1040-57.
104. Hove RJT, Lieshout LV, Brienen EAT, et al. Real-time polymerase chain reaction for detection of Isospora belli in stool samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;61(3):280-3.
105. Howe DK, Honoré S, Derouin F, et al. Determination of genotypes of Toxoplasma gondii strains isolated from patients with toxoplasmosis. J Clin Microb. 1997;35:1411-4.
106. Howe DK, Honoré S, Derouin F, et al. Determination of genotypes of Toxoplasma gondii strains isolated from patients with toxoplasmosis. J Clin Microb. 1997;35:1411-4.
107. Howe DK, Summers BC, Sibley LD. Acute virulence in mice is associated with markers on chromossome VIII in Toxoplasma gondii. Infect Immun. 1996;64:5193-8.
108. Jankü J. Pathogenes a pathologická anatomie taknazvaného vinozeného kolohome zluté skrny v oku normálne velikém a mikrophthalmickém s nálezem parazitu v sít-nici. Cas Lék Ces. 1923;62:1021-7, 1054-9, 1081-5, 1111-5, 1138-44.
109. Johnson DW, Pieniazek NJ, Griffin DW, et al. Development of a PCR protocol for sensi-tive detection of Cryptosporidium oocysts in water samples. Appl Environ Microbiol. 1995;61:3849-55.
110. Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong M, et al. PCR as a Confirmatory Technique for the Laboratory Diagnosis of Malaria. J Clin Microbiol. 2006;44:1087-9.
111. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Charoenkorn M, et al. Morphologic and molecular char-acterization of Isospora belli oocysts from patients in Thailand. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(1):107-12.
112. Jothikumar N, da Silva AJ, Moura I, et al. Detection and Differentiation of Cryptosporid-ium hominis and Cryptosporidium parvum by Dual TaqMan Assays. J Med Microbiol. 2008;57:1099-105.
113. Kehl KSC, Cicirello H, Havens PL. Comparison of four different methods for detection of Cryptosporidium species. J Clin Microbiol. 1995;33:416.
114. Khan MGM, Bhaskar KRH, Salam MA, et al. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of Leishmania DNA in buffy coat from visceral leishmania-sis patients. Parasit Vectors. 2012 Dez 5: 280-7.
115. Khan NA. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev. 2006;30(4):564-95.
116. Koehler AV, Jex AR, Haydon SR, et al. Giardia/giardiasis — A perspective on diagnostic and analytical tools. Biotechnol Adv. 2014;32(2):280-9.
117. Köhler S, Delwiche CF, Denny PW, et al. A plastid of probable green alga origin in Apicomplexa parasites. Science. 1997;275:1485-9.
118. Lee BY, Bacon KM, Connor DL, et al. The potential economic value of a Trypanoso-ma cruzi (Chagas disease) vaccine in Latin America. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(12):916.
119. Lee L, Chye TT, Karmacharya BM, et al. Blastocystis sp.: waterborne zoonotic organ-ism, a possibility? Parasit Vectors. 2012;5:130.
120. Lima LM, Dos Santos JI, Franz HCF. Atlas de Parasitologia Clínica e Doenças Infecciosas Associadas ao Sistema Digestivo. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br
121. Lima LM, Dos Santos JI, Franz HCF. Atlas de Parasitologia Clínica e Doenças Infecciosas Associadas ao Sistema Digestivo. 2012. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br
122. Literák I, Rychlík I, Svobodová V, et al. Restriction fragment lenght polymorphism and virulence of Czech Toxoplasma gondii strains. Int J Parasitol. 1998;28:1367-74.
123. Lopez SL, Bendik JM, Alliance JY, et al. Epidemiology of Cyclospora cayetanensis and other intestinal parasites in a community in Haiti. J Clin Microbiol. 2003;41(5):2047-54.

124. Lucchi NW, Narayanan J, Karell MA, et al. Molecular Diagnosis of Malaria by Photo-Induced Electron Transfer Fluorogenic Primers: PET-PCR. PLoS ONE. 2013;8(2):e56677.
125. Lucchi NW, Poorak M, Oberstaller J, et al. A New Single-Step PCR Assay for the Detec-tion of the Zoonotic Malaria Parasite Plasmodium knowlesi. PLoS ONE. 2012;7(2):e31848.
126. Magalhães-Santos IF. Transmissão oral da Doença de Chagas: breve revisão. Rev Cienc Med Biol (Salvador). 2014;13(2):226-35.
127. Malaei S, Mohebali M, Akhoundi B, et al. Evaluation of latex agglutination test (Katex) for the detection of urinary antigens in human visceral leishmaniasis. J Tehran Un Med Sci. 2006 Mai;4(1):101-8.
128. Marathe A, Parikh K. Severe diarrhoea due to Cystoisospora belli in renal transplant patient on immunosuppressive drugs. Indian J Med Microbiol. 2013;31(2):185-7.
129. Marciano-Cabral F, Cabral G. Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev. 2003;16(2):273-307.
130. Marciano-Cabral F, Jamerson M, Kaneshiro ES. Free-living amoebae, Legionella and Mycobacterium in tap water supplied by a municipal drinking water utility in the USA. J Water Health. 2010;8(1):71-82.
131. Marcipar IS, Lagier CM. Advances in serological diagnosis of Chagas' disease by using recombinant proteins. Curr Topics Trop Med. 2012;273-98.
132. Martinez-Gordillo MN, Gonzalez-Maciel A, Reynoso-Robles R, et al. Intraepithelial gi-ardia intestinalis: a case report and literature review. Medicine (Baltimore). 2014;93(29):e277.
133. Massad E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. Epidemiol Infect. 2008;136(9):1153-64.
134. Matos CS, Coelho-dos-Reis JG, Rassi A,. Applicability of an optimized non-conventional flow cytometry method to detect anti-Trypanosoma cruzi immuno-globulin G for the serological diagnosis and cure assessment following chemothera-peutic treatment of Chagas' disease. J Immunol Methods. 2011;369(1-2):22-32.
135. Maurya R, Mehrotra S, Prajapati VK, et al. Evaluation of blood agar microtiter plates for cul-turing leishmania parasites to titrate parasite burden in spleen and peripheral blood of pa-tients with visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2010 Mai:48(5):1932-4.
136. Minetti C, Lamden K, Durband C, et al. Determination of Giardia duodenalis assem-blages and multi-locus genotypes in patients with sporadic giardiasis from England. Parasit Vectors. 2015;8:444.
137. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemi-ológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ed. Ministério da Saúde, 2006.
138. Miyamoto Y, Eckmann L. Drug Development Against the Major Diarrhea-Causing Para-sites of the Small Intestine, Cryptosporidium and Giardia. Front Microbiol. 2015;6:1208.
139. Mohaghegh MA, Fata A, Salehi GH, et al. Molecular identification of Leishmania species using samples obtained from negative stained smears. Iranian J Parasitol. 2013 Jun 8(2):337-41.
140. Mohammadiha A, Mohebali M, Haghighi A, et al. Comparison of real-time PCR and conven-tional PCR with two DNA targets for detection of Leishmania (Leishmania) infantum infection in human and dog blood samples. Exp Parasitol. 2013 Jan 133(1):89-94.
141. Montalvo R, Ticona E, Ñavincopa M, et al. Diarrea recurrente por Cystoisopora belli en pacientes con infección por vih con targa. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2013;30(2):326-30.
142. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004;363:1965-76.
143. Mugasa CM, Deborggraeve S, Schoone GJ, et al. Accordance and concordance of PCR and NASBA followed by oligochromatography for the molecular diagnosis of Trypanosoma brucei and Leishmania. Trop Med Int Health. 2010 Jul 15(7):800-5.
144. Murphy SC, Hoogestraat DR, SenGupta DJ, et al. Molecular diagnosis of Cystoisosporia-sis Using extended-range PCR screening. JMD. 2011;13(3):359-62.
145. Neves DP, Melo AL, Genaro O, et al. Parasitologia Humana. 11.ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2011. p.546.
146. Newman RD, Jaeger KL, Wuhib T, et al. Evaluation of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Cryptosporidium oocysts. J Clin Microbiol. 1993;31:2080.
147. Nicole C, Manceaux L. Sur une infection a corps de leishman (ou organismevoisins) du gondii: C.R. Acad Sci. 1908;147:763-6.
148. Noël C, Peyronnet C, Gerbod D, et al. Phylogenetic analysis of Blastocystis isolates from different hosts based on the comparison of smallsubunit rRNA gene sequences. Mol Biochem Parasitol. 2003;126:119-23.
149. Oliveira FMS, Neumann E, Gomes MA, et al. Entamoeba dispar: Could it be pathogen-ic. Trop Parasitol. 2015;5(1):9-14.
150. OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde. Estimación Cuantitativa de la Enfer-medad de Chagas en las Américas, 2006. p.28. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.bvsops.org.uy /pdf/chagas19.pdf
151. Ortega YR, Gilman RH, Sterling CR. A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eime-riidae) from humans. J Parasitol. 1994;80:625-9.
152. Ortega YR, Sterling CR, Gilman RH, et al. Cyclospora species – a new protozoan patho-gen of humans. N Engl J Med. 1993;328:1308-12.
153. Pacheco FT, Silva RK, Martins AS, et al. Differences in the detection of Cryptosporidium and Isospora (Cystoisospora) oocysts according to the fecal concentration or staining method used in a clinical laboratory. J Parasitol. 2013;99(6):1002-8.
154. Pandey K, Pandey BD, Mallik AK, et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by polymerase chain reaction of DNA extracted from Giemsa's solution-stained slides. Parasitol Res. 2010 Ago 107(3):727-30.
155. Patel JC, Oberstaller J, Xayavong M, et al. Real-Time Loop--Mediated Isothermal Am-plification (RealAmp) for the Species-Specific Identification of Plasmodium vivax. PLoS ONE. 2013;8(1):e54986.
156. Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, et al. Clinical and microbiological aspects of Trichomonas vaginalis. Clin Microbiol Rev. 1998;1:300-17.
157. Pieniazek NJ, Bornay-Llinares FJ, Slemenda SB, et al. New Cryptosporidium genotypes in HIV-infected Persons. Emerg Infect Dis. 1999;5:444-9.
158. Pieniazek NJ, Slemenda SB, da Silva AJ, et al. PCR confirmation of infection with Cyclo-spora cayetanensis. Emerg Infect Dis. 1996;2:357-9.
159. Pinon JM, Dumon H, Chemla C, et al. Strategy for Diagnosis of Congenital Toxo-plasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and Standard Methods

for Postnatal Detection of Immunoglobulin G, M, and A Antibodies. J Clin Microb. 2001;39(6):2267-71.
160. Pontes VMO, Souza JAS, Cruz FMT, et al. Reações adversas em pacientes com doen-ça de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. Rev Bras Med Trop. 2010;43(2):182-7.
161. Popruk S, Udonsom R, Koompapong K, et al. Subtype Distribution of Blastocystis in Thai-Myanmar Border, Thailand. Korean J Parasitol. 2015;53(1):13-9.
162. Qvarnstrom Y, James C, Xayavong M, et al. Comparison of Real-Time PCR Protocols for Differential Laboratory Diagnosis of Amebiasis. J Clin Microbiol. 2005;43(11):5491-7.
163. Qvarnstrom Y, Wei-Pridgeon Yuping, Li Wen, et al. Draft Genome Sequences from Cyclospora cayetanensis Oocysts Purified from a Human Stool Sample. Genome An-nounc. 2015;3(6):e01324-15.
164. Ragavan ND, Govind SK, Chye TT, et al. Phenotypic variation in Blastocystis sp. ST3. Parasi Vectors. 2014;7:404.
165. Ragavan ND, Kumar S, Chye TT, et al. Blastocystis sp. in Irritable Bowel Syndrome (IBS) - Detection in stool aspirates during colonoscopy. PLoS One. 2015;10(9):e0121173.
166. Rassi Júnior A, Rassi A, Rassi SG. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. Circulation. 2007;115:1101-8.
167. Ravindran R, Anam K, Bairagi BC, et al. Characterization of immunoglobulin G & its subclass response to Indian kala-azar infection before and after chemotherapy. Infect Immun. 2003 Out:72(2):863-70.
168. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent Developments for Diagnosis of Toxo-plasmosis. J Clin Microbiol. 2004;42(3):941-5.
169. Rendell VR, Gilman RH, Valencia E, et al. Trypanosoma cruzi-Infected Pregnant Wom-en without Vector Exposure Have Higher Parasitemia Levels:Implications for congeni-tal transmission risk. PLoS One. 2015;10(3).
170. Roberts T, Stark D, Harkness J, et al. Update on the pathogenic potential and treatment options for Blastocystis sp. Gut Pathogens. 2014;6:17.
171. Robertson LJ, Sprong H, Ortega YR, et al. Impacts of globalisation on foodborne para-sites. Trends Parasitol. 2014;30(1):37-52.
172. Rsenblatt JE, Sloan LM. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for de-tection of Cryptosporidium spp. in stool specimens. J Clin Microbiol. 1993;31:1468.
173. Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah GH, et al. Enzyme--linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) & IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2002 Mar;40(3):1037-43.
174. Ryan U, Hijjawi N. New developments in Cryptosporidium research. Int J Parasitol. 2015 May;45(6):367-73.
175. Sánchez CL, Albajar-Viñas P, Wilkins PP, et al. Avaliação comparativa de 11 testes de diagnóstico para detectar anticorpos do Trypanosoma cruzi em bancos de plas-ma em regiões endêmicas e não endêmicas. J Clin Microbiol. 2014.
176. Santin M, Gomez-Munoz MT, Solano-Aguilar G, et al. Development of a new PCR pro-tocol to detect and subtype Blastocystis spp. from humans and animals. Parasitol Res. 2011;109:205-12.
177. Santos HLC, Bandyopadhyay K, Bandea R, et al. LUMINEX: a new technology for the simultaneous identification of five Entamoeba spp. commonly found in human stools. Parasit Vectors. 2013;6:69.
178. Santos HLC, Peralta RHS, Macedo HW, et al. Comparison of multiplex-PCR and antigen detection for differential diagnosis of Entamoeba histolytica. Braz J Infect Dis. 2007;11(3):365-70.
179. Schafer KR, Shah N, Almira-Suarez MI, et al. Disseminated Balamuthia mandrillaris Infection. J Clin Microbiol. 2015;53(9):3072-6.
180. Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(Suppl. I):75-85.
181. Schuster FL, Visvesvara GS. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of water-borne zoonotic disease. Vet Parasitol. 2004;126(1-2):91-120.
182. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol. 2004;34(9):1001-27.
183. Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free--living amebas. Clin Mi-crobiol Rev. 2002;15(3):342-54.
184. Shields JM, Joo J, Kim R, et al. Assessment of three commercial DNA extraction kits and a laboratory-developed method for detecting Cryptosporidium and Cyclospora in raspberry wash, basil wash and pesto. J Microbiol Methods. 2013;92:51-8.
185. Sibley LD. Toxoplasma gondii: perfecting an intracellular life style. Traffic. 2003;4:581-6.
186. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of Acanthamoeba. Parasit Vectors. 2012;5:6.
187. Siddiqui R, Khan NA. Primary amoebic meningoencephalitis caused by Naegleria fowleri: an old enemy presenting new challenges. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(8):e3017.
188. Siddons CA, Chapman PA, Rush BA. Evaluation of an enzyme immunoassay kit for de-tecting Cryptosporidium in faeces and environmental samples. J Clin Pathol. 1992;45:479.
189. Sloan LM, Rosenblatt JE. Evaluation of an immunoassay for the detection of Cryptosporidium stool specimens. 91st Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Dallas, TX. 1991. p.22.
190. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, et al. High sensitivity detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol. 1993;61:315-20.
191. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. Arq Bras Cardiol. 2011;97(2 supl 1):1-48.
192. Spalding SM, Amendoeira MRR, Coelho JMC, et al. Otimização da reação em Ca-deia da Polimerase para Detecção de Toxoplasma gondii em Sangue Venoso e Pla-centa de Gestantes. J Bras Patol Med Lab. 2002;38(2):105-10.
193. Spalding SM, Amendoeira MRR, Klein CH, et al. Serological screening and toxo-plasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop (São Paulo). 2005;38(2):173-7.
194. Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2011;105(1):1-6.
195. Stensvold CR, Christiansen DB, Olsen KEP, et al. Short report: Blastocystis sp. subtype 4 is common in danish Blastocystis -positive patients presenting with acute diarrhea. Am J Trop Med Hyg. 2011;84(6):883-5.
196. Stenzel DJ, Boreham PFL. Blastocystis hominis revisited. Clin Microbiol Rev. 1996;9:563-84.
197. Sundar S, Pai K, Sahu M, et al. Immunochromatogaphic strip test detection of anti k39 anti-body in Indian visceral leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol. 2002 Jan:96(1):19-23.

198. Takahashi H, Falk GA, Cruise M, et al. Chronic cholecystitis with Cystoisospora belli in an immunocompetent patient. BMJ Case Rep. 2015;2015.
199. Tan KSW, Mirza H, Teo JD, et al. Current views on the clinical relevance of Blastocystis spp. Curr Infect Dis Rep. 2010;12: 28-35.
200. Tan KSW. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of Blas-tocystis spp. Clin Microbiol Rev. 2008;21(4):639-65.
201. Tanyuksel M, Petri Jr WA. Laboratory Diagnosis of Amoebiasis. Clin Microbiol Rev. 2003;16:713-29.
202. Torres CM. Sur une nouvelle maladie de l'homme, charactérisée par la présence d'une parasite intracellulaire, très proche de Toxoplasma et de l'Encephalitozoon, dans le tissu musculaire cardique, les muscles du squelette, le tissu cellulair sourcu-tane et le tissu nerveux. C R Soc Biol. 1927;97:1778-81.
203. Tyzzer EE. "An extracellular Coccidium, Cryptosporidium Muris (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric Glands of the Common Mouse.". J Med Res. 1910;23(3):487-510.
204. Ud Din N, Torka P, Hutchison RE, et al. Severe Isospora (Cystoisospora) belli diarrhea preceding the diagnosis of human T--cell-leukemia-virus-1-associated T-cell lymphoma. Case Rep Infect Dis. 2012;2012:640104.
205. Valencia JIZ, Rojas-Cruz C. Una actualización sobre blastocystis sp. Rev Gastrohnup. 2012;14(3):94-100.
206. Van der Meide W, Guerra J, Schoone G, et al. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of Leishmania parasites. J Clin Microbiol. 2008 Jan 46(2):73-8.
207. Vassalos CM, Spanakos G, Vassalou E, et al. Differences in Clinical Significance and Morphologic Features of Blastocystis sp Subtype 3 Constantine. Am J Clin Pathol. 2010;133:251-8.
208. Vaz R, Rauli P, Mello RG, et al. Toxoplasmose Congênita: Uma Doença Negligencia-da? Atual política de saúde pública brasileira, Field Actions Science Reports [Online], Special Issue 3|2011, Online since 02 November 2011, connection on 05 September 2015. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://factsreports.revues.org/1107
209. Vaz RS, Thomaz-Soccol V, Sumikawa E, et al. Serological prevalence of Toxoplasma gondii antibodies in pregnant women from Southern Brazil. Parasitol Res. 2010;106:661-5.
210. Velasquez DE, Arvelo W, Cama VA, et al. Molecular insights for Giardia, Cryptosporidi-um, and soil-transmitted helminths from a facility-based surveillance. Am J Trop Med Hyg. 2011;85(6):1141-3.
211. Verweij JJ, Laeijendecker D, Brienen EA, et al. Detection of Cyclospora cayetanensis in travelers returning from the tropics and subtropics using microscopy and real-time PCR. Int J Med Microbiol. 2003;293:199-202.
212. Vicente NA, Almeida LMB, Otaviani Di AP, et al. Pesquisa de oocistos de Cryptospori-dium sp em fezes: comparação entre os métodos de Kinyoun modificado e de heine. Rev Soc Bras Med Trop [online]. 1996;29(6):575-8.
213. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoe-bae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea. FEMS Immunol Med Microbiol. 2007;50(1):1-26.
214. Visvesvara GS. Amebic meningoencephalitides and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. Curr Opin Infect Dis. 2010;23(6):590-4.
215. Visvesvara GS. Infections with free-living amebae. Handb Clin Neurol. 2013;114:153-68.
216. Volotao AC, Costa-Macedo LM, Haddad FS, et al. Genotyping of Giardia duodenalis from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. Acta Trop. 2007;102(1):10-9.
217. Wang JY, Ha Y, Gao CH, et al. The prevalence of canine Leishmania infantum infection in western China detected by PCR and serological tests. Parasit Vectors. 2011;4:69-76.
218. Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, et al. Blastocystis, an unrecognized parasite: na overview of pathogenesis and diagnosis. Ther Adv Infect Dis. 2013;1(5):167-78.
219. Weina PJ, Neafle RC, Wortmamm G, et al. Old World leishmaniasis: an emerging infection among deployed US military and civilian workers. Clin Infect Dis. 2004 Dez 39(11):1674-80.
220. Weirather JL, Jerônimo SMB, Gautam S, et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of Leishmania spp. in human samples. J Clin Micro-biol. 2011 Nov 49;(11)3892-904.
221. Workowski KA, Bolan GA. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. MMWR Recomm Rep. 2015;64:1-137.
222. World Health Organization. Amoebiasis. Weekly Epidemiological Record. 1997;72:97-9.
223. World Health Organization. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sex-ually Transmitted Infections - 2008. World Health Organization, Department of Repro-ductive Health and Research, Geneva, 2012.
224. Xia Z, Sonnad S, Turner S, et al. Evaluation of a microtiter assay for detection of Cryptosporidium antigen in stool. 92nd Annual Meeting of the American Society for Microbiology, New Orleans, 1992. p.106.
225. Yadav D, Aneja S, Dutta R, et al. Youngest survivor of naegleria meningitis. Indian J Pediatr. 2013;80(3):253-4.
226. Zerpa LR, Espinoza YB, Franco AFH. Prueba de susceptibilidad antiparasitaria in vitro para Blastocystis hominis, Entamoeba histolytica-E. dispar, Balantidium coli. An Fac Med. 2012;73(1):47-9.
227. Zerpa LR, Huicho L, Náquira C, et al. A simplified culture method for Blastocystis hom-inis. Rev Mex Patol Clin. 2000;47(1):17-9.
228. Zierdt CH, Tan H. Endosymbiosis in Blastocystis hominis. Exp Parasitol. 1976;39:422-30.

45

capítulo

Alessandra Loureiro Morassutti ▪ Carolina De Marco Veríssimo

Helmintos

Classificamos como helmintos os animais parasitos de corpo vermiforme. Tanto vermes chatos quanto vermes cilíndricos são denominados genericamente de helmintos. As helmintíases são, portanto, infecções relacionadas a diferentes espécies de helmintos.

A maioria das helmintíases ocorre no trato digestivo e, por isso, frequentemente, à suspeita de infecção parasitária, exames de fezes são solicitados. Esses exames incluem duas etapas principais: preparação da amostra e análise microscópica. A preparação pode ser simples, como a sedimentação espontânea, ou mais elaborada, nesse caso incluindo etapas de concentração (ver Capítulo 46), porém o diagnóstico final dependerá sempre da busca e da identificação de estruturas parasitárias (ovos, larvas, verme etc.) ao microscópio. Portanto, para o correto diagnóstico, o observador deverá conhecer as características morfológicas de cada helminto e o tipo de amostra biológica em que as formas parasitárias poderão ser encontradas, bem como a capacidade das diferentes técnicas de exame parasitológico de fezes (EPF) para isolamento de diferentes formas parasitárias.

Além das parasitoses intestinais, existem também infecções teciduais e sanguíneas causadas por helmintos. Neste capítulo serão abordados os principais helmintos que causam doenças em humanos separados de acordo com os achados morfológicos que poderão ser encontrados em diferentes amostras biológicas (Tabela 45.1):

1. Ao exame de amostras fecais
2. Ao exame de amostras sanguíneas e liquor
3. Ao exame de material de biópsias e/ou punções e escarro

Tabela 45.1 Resumo dos principais helmintos e suas formas parasitárias passíveis de serem encontradas ao exame de diferentes amostras biológicas.

Material biológico	Forma parasitária encontrada	Helminto
Fezes	Larvas	*Strongyloides stercoralis*
	Ovos	Ancilostomídeos *Ascaris lumbricoides* *Enterobius vermicularis* *Fasciola hepatica* *Paragonimus westermani* *Schistosoma mansoni* *Taenia* spp. *Trichuris trichiura* *Hymenolepis nana* *Hymenolepis diminuta* *Diphyllobothrium latum*

(*Continua*)

Tabela 45.1 Resumo dos principais helmintos e suas formas parasitárias passíveis de serem encontradas ao exame de diferentes amostras biológicas. (*Continuação*)

Material biológico	Forma parasitária encontrada	Helminto
Fezes	Vermes adultos/proglote	*Ancylostoma duodenale* *Ascaris lumbricoides* *Enterobius vermicularis* *Taenia* spp. *Trichuris trichiura*
Lavado brônquio alveolar, escarro	Larvas	*Strongyloides stercoralis* *Ascaris lumbricoides* *Ancylostoma duodenale*
	Ovos	*Paragonimus westermani*
Líquido duodenal	Larvas e vermes adultos	*Strongyloides stercoralis*
Liquor	Larvas	*Angiostrongylus cantonensis*
Intervenções cirúrgicas Intestinais	Ovos e vermes adultos	*Trichuris trichiura* *Enterobius vermicularis* *Ancylostoma duodenale* *Angiostrongylus costaricensis** *Schistosoma mansoni*
	Ovos e proglotes	*Taenia* spp.
Outras biópsias	Membranas do cisto hidático	*Echinococcus granulosus*
	Cisticerco	*Taenia solium*
	Vermes adultos	*Wuchereria bancrofti***
Punções	Protoescólex	*Echinococcus granulosus*
Sangue	Larvas	*Wuchereria bancrofti*

*Dentro da artéria, **Biópsias de linfonodo.

Fonte: Acervo dos autores.

AO EXAME DE AMOSTRAS FECAIS

Ancilostomídeos

Doença: Ancilostomíase, ancilostomose, amarelão.

Duas espécies estão compreendidas aqui, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus.* Os ancilostomídeos são vermes cilíndricos com cerca de um centímetro e meio de comprimento, quando adultos. Possuem dentes ou placas calcárias que os auxiliam na fixação e na permanência na parede do duodeno, hábitat natural de ambas as espécies e, por isso, raramente exemplares adultos são vistos nas fezes. Os ovos desses parasitos são depositados no intestino delgado e, assim, podem ser encontrados nas fezes, o que configura o achado diagnóstico para essas infecções (Figura 45.1). Como as espécies não são distinguíveis por microscopia óptica, a parasitose é denominada ancilostomíase para qualquer que seja a espécie presente. Os vermes fixados na parede do duodeno se alimentam de sangue e causam gotejamento constante de sangue do hospedeiro, o que pode levar ao desenvolvimento de anemia. Por causa da cor pálida que o indivíduo pode apresentar, a ancilostomíase é conhecida como "amarelão". Essa doença se tornou também popularmente conhecida como "doença de Jeca Tatu", um personagem das histórias de Monteiro Lobato que tinha infecção por ancilostomídeo.

Os ovos que saem nas fezes contaminam o ambiente em locais de precária condição sanitária, como esgotos a céu aberto ou vazamentos de tubulações. Uma vez no ambiente, em menos de 24 horas os ovos completam sua embriogênese e eclodem. Após cinco dias da eclosão uma larva capaz de penetrar a pele está formada e, então, humanos podem adquirir a infecção pelo contato direto da pele com as larvas.

Essas larvas são microscópicas, não sendo possível visualizar a penetração. Após a passagem pela epiderme, as larvas ganham a corrente sanguínea ou linfática e atingem o pulmão, onde atingem o espaço alveolar, migram em direção a traqueia e são finalmente deglutidas, atingindo o intestino e fixando-se no duodeno. Lá machos e fêmeas copularão e produzirão ovos, completando assim o ciclo de vida do parasito.

- **Infecção:** Penetração ativa das larvas na pele.
- **Diagnóstico:** Exame parasitológico de fezes, sendo o método de Willis o mais adequado. Visualização dos ovos em aumento de 100× é o suficiente e não necessita coloração. Os ovos possuem forma oval ou elíptica e medem 60 µm de comprimento por 40 µm largura, com uma casca bem fina e um espaço transparente entre a casca e as células embrionárias (Figura 45.1).

Figura 45.1 Ovo de ancilostomídeo.
Fonte: Camila Gonçalvez dos Santos – Parasitologia PUCRS.

No que diz respeito à relação clínico-laboratorial, durante a migração das larvas de ancilostomídeos pelo pulmão pode haver tosse e complicações pulmonares. Ao hemograma, frequentemente pacientes com essa infecção apresentam número elevado de eosinófilos, cerca de 30%, além de baixa contagem de eritrócitos. Além disso, os pacientes podem apresentar resultado positivo na pesquisa de sangue oculto nas fezes.

Comentários

1. A coleta das fezes deve ser feita com agentes preservantes, como formol 10%, para evitar que os ovos eclodam. O não uso de preservante pode permitir o desenvolvimento dos ovos, e larvas rabditoides poderão estar presentes na amostra, o que pode levar o examinador a confundir essas com larvas de *Strongyloides stercoralis.*
2. O método de Kato-Katz pode ser utilizado para o diagnóstico parasitológico, porém deve-se respeitar o tempo máximo de duas horas entre o preparo da lâmina e o exame ao microscópio. Após esse período os ovos ficam invisíveis.
3. Uma espécie de ancilostomídeo típico de cães e gatos pode também penetrar a pele de humanos; é, portanto, uma zoonose. Nesse caso o ciclo evolutivo do parasito é interrompido porque as larvas ficam retidas na região epidérmica, causando lesões serpiginosas conhecidas como larva *migrans* cutânea e/ou popularmente como "bicho geográfico".

Ascaris lumbricoides

Doença: Ascaridíase.

Esse é um dos parasitos mais comumente encontrados em exames parasitológicos de fezes. Estima-se que 25% da população mundial esteja infectada com *A. lumbricoides.* Esse é um nematódeo que vive na luz intestinal, não possui dentes nem ventosa e sua estratégia para manter-se no duodeno é a constante movimentação contrária ao peristaltismo. Uma complicação grave associada a essa infecção é conhecida como "bolo de áscaris", que ocorre quando há uma infecção maciça e os vermes acabam se entrelaçando, podendo causar obstrução intestinal. Também em casos de infecção com alta carga parasitária, vermes podem ser expelidos pelas aberturas nasais e orais. Em alguns casos pode ocorrer migração errática dos vermes, principalmente por causa da ingestão de condimentos ou medicamentos que podem ser irritativos para o parasito. Nesses casos, os parasitos podem alcançar locais fora do intestino delgado, seu local habitual de parasitismo. Entre os locais mais comuns que o *Ascaris* pode atingir em eventos de migração errática estão: 1) vesícula biliar, levando a dor aguda e colangite; 2) apêndice, levando a um quadro de apendicite; 3) pâncreas.

A infecção ocorre através da ingestão de ovos embrionados. Os vermes adultos são dióicos e as fêmeas liberam cerca de 200 mil ovos por dia, que chegam ao meio externo junto das fezes. Em locais onde não há saneamento adequado, os ovos que foram fecundados no útero da fêmea desenvolverão uma larva em seu interior. Ao contrário dos ancilostomídeos, esses ovos não eclodem no ambiente externo. Os ovos precisam ser ingeridos pelo ser humano para que haja a infecção. Portanto, alimentos e água contaminados, hábitos de geofagia e/ou transtorno de alotriofagia podem ser fontes da infecção.

Após ingestão e passagem pelos sucos gástricos, do ovo eclode uma larva capaz de perfurar a parede do intestino e então atingir a corrente sanguínea venosa ou linfática. As larvas passa pelo fígado, via sistema porta, atinge o coração e então entram na circulação arterial. Quando as larvas chegam ao pulmão 4 a 5 dias após a infecção, rompem os capilares dos alvéolos, migram pela árvore brônquica e chegam à faringe, onde são deglutidas. Nessa fase podem causar tosse e serem expelidas. Ao atingir esse estágio a larva mede cerca de 1,3 mm e pode ser identificada em exames de escarro. Quando deglutidas chegam ao intestino delgado e ali se tornam vermes adultos.

- **Infecção:** Ingestão de ovos larvados em alimentos ou água contaminados com fezes humanas.
- **Diagnóstico:** Exame macroscópico das fezes: pode-se visualizar vermes adultos nas fezes. Esses são os maiores nematódeos que infectam humanos, sendo que os vermes machos medem cerca de 15 a 30 cm, e as fêmeas entre 35 e 40 cm.

Exame parasitológico de fezes pelo método de sedimentação espontânea. Exame microscópico para visualização de ovos. Os ovos medem entre 45 e 75 µm de comprimento e 35 a 50 µm de diâmetro. Apresentam frequentemente uma camada externa rica em albumina adquirida no útero das fêmeas (Figura 45.2) e podem ter formato mais alongado quando se trata de um ovo que não foi fecundado (Figura 45.3).

Figura 45.2 Ovo fértil de *A. lumbricoides*. Coloração com Lugol.
Fonte: Carolina M. Veríssimo – Parasitologia PUCRS.

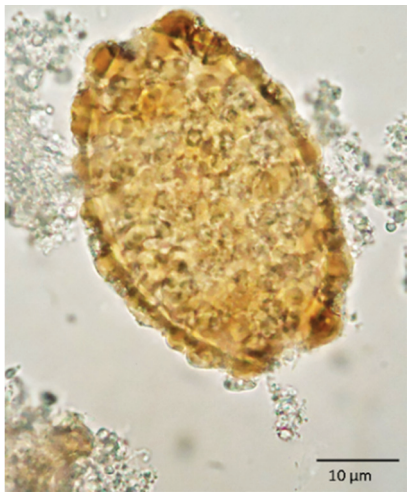


Figura 45.3 Ovo infértil de *A. lumbricoides*. Coloração com Lugol.
Fonte: Carolina M. Veríssimo – Parasitologia PUCRS.

Ovos descorticados de *A. lumbricoides* (Figura 45.4) podem estar presentes nas fezes e, nesse caso, poderão ser confundidos com ovos de ancilostomídeos pela aparência e pelo tamanho reduzido (Figura 45.1).

Figura 45.4 Ovo decorticado de *A. lumbricoides*. Coloração com Lugol.
Fonte: Lenilza Mattos Lima (http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br).

Diphyllobothrium latum

Doença: Difilobotríase.

Essa é uma infecção muito frequente em países como Rússia, Japão e Finlândia. Tem-se relatado vários casos e surtos no Brasil e outros países sul-americanos nos últimos anos, principalmente devido ao aumento do consumo de carne crua de peixes, como salmão e sardinha. Além disso, pratos contendo peixes crus preparados apenas com adição de limão, sal e vinagre, tais como "carpaccio" e "ceviche" também estão atrelados à infecção, pois não há inviabilização dos ovos do parasito.

O *Diphyllobothrium* é um cestódeo que pertence à mesma classe das espécies de *Taenia* spp., portanto, podemos também chamá-los genericamente de tênia. Essa tênia possui um complexo ciclo de vida, que envolve dois hospedeiros intermediários, crustáceos e peixes, e um mamífero carnívoro como hospedeiro definitivo. O verme adulto possui escólex com ventosas longitudinais que permitem a fixação ao intestino delgado, onde o parasito pode atingir 25 m, divididos em milhares de proglotes características. Na maioria dos casos reportados, no entanto, essa tênia atinge entre 2 e 15 m, no máximo. O parasito pode sobreviver no hospedeiro por muitos anos, tendo sido relatados casos de infecções de mais de 20 anos, sendo essa infecção geralmente assintomática.

- **Infecção:** Ingestão de carne crua de peixes contendo a larva do parasito

- **Diagnóstico:** Exame macroscópico das fezes: pelo achado de proglotes nas fezes ou durante tamisação. A proglote possui o poro genital na região mediana do segmento (Figura 45.5).

Exame parasitológico de fezes pelo método de Sedimentação Espontânea. Exame microscópico para visualização de ovos, os quais são operculados e imaturos quando recém-depositados, e medem entre 55 e 75 µm de comprimento e 40 a 50 µm de largura (Figura 45.6).

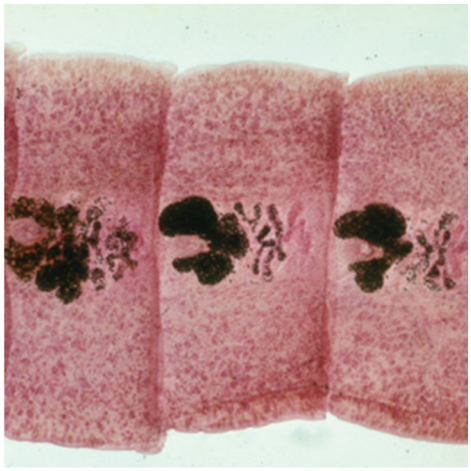


Figura 45.5 Proglote de *D. latum*. Coloração com Carmim.
Fonte: http://www.cdc.gov/dpdx/.

Figura 45.6 Ovo de *Diphyllobothrium latum*. A seta indica o opérculo.
Fonte: Camila Gonçalvez dos Santos – Parasitologia PUCRS.

Clinicamente, a infecção por *Diphyllobothrium* se apresenta assintomática na maioria dos casos. Entretanto, é válida a suspeita e pesquisa parasitológica desse parasito em regiões endêmicas onde pacientes apresentem um quadro de anemia relacionado à falta de vitamina B_{12} e consequente deficiência na eritrogênese, além, é claro, do histórico de ingestão de carne de peixe crua.

Enterobius vermicularis

Doença: Enterobíase (antigamente chamada de oxiurose ou oxiuríase).

O *Enterobius* é um verme cilíndrico com aproximadamente 1 cm de comprimento e 0,2 cm de largura. Vivem no intestino grosso de seres humanos e podem causar prurido intenso na região perianal, irritabilidade e perda de atenção. Os vermes adultos podem ser encontrados no exame macroscópico das fezes. Os ovos são depositados pelas fêmeas na região do períneo, de modo que não é frequente o encontro de ovos ao exame parasitológico das fezes. Após contato com o ambiente externo ocorre a embriogênese, e os ovos passam a ser infectantes novamente em apenas seis horas.

- **Infecção:** Ingestão e/ou inalação de ovos larvados.
- **Diagnóstico:** O relato de prurido anal e inquietação, especialmente por crianças, é um importante indicativo de enterobíase, que deve ser investigada através do exame adequado. Apesar de, em geral, essa ser uma parasitose assintomática, há relatos na literatura de complicações como abdome agudo, apendicite, peritonite e doença inflamatória pélvica.

Encontro de vermes e/ou ovos (Figura 45.7) na região do períneo. O Método da Fita Gomada ou *Swab* anal é o indicado para coleta do material. Deve ser feita coleta de material na região perianal/anorretal antes da higienização matinal por meio de fita adesiva, fita gomada ou *swab* anal e, em seguida, deve-se proceder à visualização direta ao microscópio. Os ovos medem entre 50 e 60 µm de comprimento e 20 e 30 µm de largura, com um característico formato da letra "D".

Figura 45.7 Ovo de *E. vermicularis*.
Fonte: Alessandra L. Morassutti – Laboratório de Parasitologia da PUCRS.

Comentários

1. Ao exame parasitológico de fezes, raramente (10%) são encontrados os ovos de *E. vermicularis*, sendo, portanto, o Método de Fita Gomada o mais eficaz para diagnóstico dessa parasitose.
2. Os ovos permanecem viáveis por um longo período e são facilmente colocados em suspensão, por isso, a limpeza da casa deverá ser feita, evitando a criação de aerossóis.
3. É comum a infecção em todos os membros de uma família e em pessoas que convivem em ambientes fechados como creches, asilos e internatos.

Schistosoma mansoni

Doença: Esquistossomose.

O parasito *Schistosoma mansoni* vive nas veias mesentéricas de humanos onde as fêmeas depositam seus ovos. Esses podem atravessar o epitélio de vasos sanguíneos e alcançar a luz intestinal. Uma vez no intestino, os ovos saem nas fezes de indivíduos infectados e, quando em contato com a água, uma larva ciliada, o miracídio, eclode do ovo (Figura 45.8) e infecta o hospedeiro intermediário, o molusco aquático *Biomphalaria glabrata*. O miracídio se transforma em esporocisto, o qual produz as larvas infectantes ao vertebrado, as cercárias. Essas emergem do molusco na presença de temperatura e luminosidade adequadas, ficam livre-natantes e penetram a pele íntegra dos seres humanos. Após a entrada, a larva, agora chamada de esquistossômulo, migra pela corrente sanguínea e se aloja no sistema porta-hepático, principalmente na veia porta e nas ramificações mais finas do plexo mesentérico inferior, onde se torna adulta. Os vermes adultos se organizam aos pares, copulam e dão início à oviposição. Os ovos eliminados pelas fêmeas atravessam o vaso sanguíneo e atingem a luz intestinal, quando é possível fazer o diagnóstico pela presença de ovos nas fezes.

A infecção se caracteriza por duas fases distintas: aguda e crônica. A fase aguda apresenta predominante a dermatite cercariana, que é uma inflamação da pele no local da penetração da cercária. A fase crônica apresenta a principal patogenia associada à esquistossomose, sendo causada pelos ovos que não atingem a luz intestinal, ficando retidos no fígado e intestinos causando uma resposta imune celular granulomatosa aos antígenos secretados pelo ovo do *S. mansoni*. Essa reação pode progredir para fibrose, culminando na hipertensão do sistema porta. Variações clínicas podem ocorrer nessa fase, gerando três formas principais da doença: intestinal (predominante), hepatoesplênica e pulmonar.

Na fase crônica, a quantidade de ovos observada nas fezes é muito diminuída devido à intensa reação inflamatória e, por consequência, ao maior acúmulo de ovos nos tecidos. Assim, o diagnóstico precisa receber atenção especial, pois os testes comumente usados na rotina clínica, como Kato-Katz e sedimentação espontânea, apresentam baixa sensibilidade e consequentemente resultados falsos-negativos. Nesse caso pode ser necessária a realização de biópsias e/ou a utilização de métodos diagnósticos nas fezes que apresentem sensibilidade superior aos de rotina, como os métodos de Helmintex e Gradiente salino, por exemplo.

- **Infecção:** Penetração ativa das cercárias pela pele.
- **Diagnóstico:** Exame parasitológico das fezes por diversos métodos podem ser usados (ver Capítulo 46). O exame microscópico visa à identificação do ovo (Figura 45.8 e 45.9). Os ovos medem entre 114 e 180 µm de comprimento por 45 e 70 µm de largura e apresentam um espinho lateral característico da espécie *S. mansoni*.

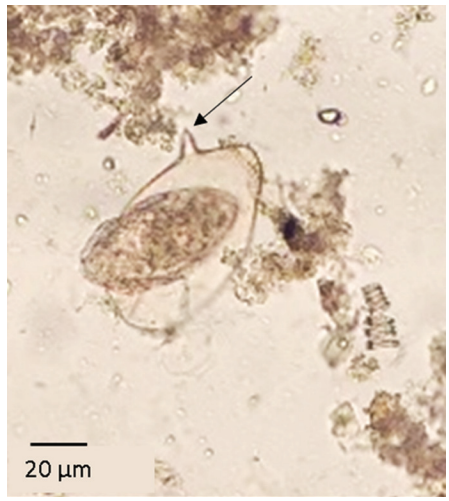


Figura 45.8 Ovo de *Schistosoma mansoni*. Ovo eclodindo. A seta evidencia o espinho lateral.
Fonte: Alessandra L. Morassutti – Laboratório de Parasitologia da PUCRS.

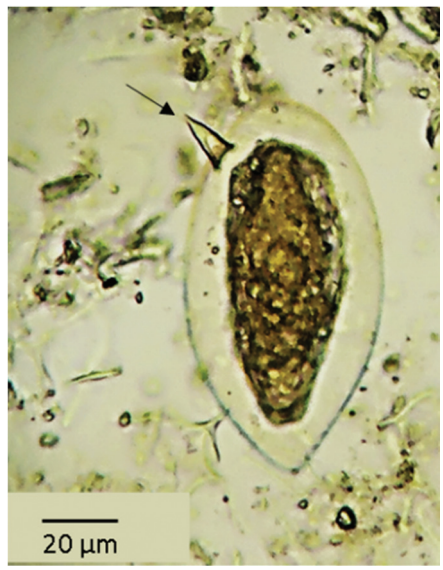


Figura 45.9 Ovo de *S. mansoni*. A seta evidencia o espinho lateral.
Fonte: Alessandra L. Morassutti – Laboratório de Parasitologia da PUCRS.

Exames sorológicos: Elisa – busca de anticorpos contra os antígenos CCA (antígeno catódico circulante), CAA (antígeno anódico circulante) e antígeno solúvel de ovo (SEA); detecção de IgM por imunofluorescência ou por Elisa.

Clinicamente, o paciente com esquistossomose poderá apresentar diferentes sinais e sintomas, conforme a fase em que se encontra da infecção. Há indicação para a investigação da infecção naqueles pacientes vindos de áreas endêmicas que apresentem sinais de dermatite cercariana (fase aguda) ou ascite abdominal, alterações intestinais e/ou hepáticas (fase crônica).

Comentários

1. Regiões de baixa endemicidade (onde a taxa de transmissão da doença é muito baixa), os indivíduos infectados apresentam baixa carga parasitária. Consequentemente, são observados poucos ovos nas fezes e o diagnóstico é dificultado, ou às vezes inviabilizado, quando testes diagnósticos de rotina clínica (Kato-Katz e sedimentação espontânea) são utilizados. Esse fenômeno também pode ser observado em indivíduos que tenham realizado tratamento recente com Praziquantel® mas permaneceram infectados, eventualmente com poucos vermes, liberando poucos ovos nas fezes. Portanto recomenda-se que, nos casos de doença crônica, tratamento recente, ou procedência de áreas de baixa transmissão da infecção, sejam utilizados os métodos de Helmintex e/ou Gradiente salino, que são mais sensíveis.
2. Os exames sorológicos podem ser um indicativo de infecção. No entanto, não discriminam infecção passada e ativa. Aqueles testes com antígeno circulante CCA têm um potencial para resolver esta questão, já que o antígeno circulante somente estará presente na fase ativa da infecção. Esse teste, na versão imunocromatográfica rápida, ainda em fase de avaliação no Brasil, tem apresentado resultados satisfatórios para regiões endêmicas, mas ainda permanece a dúvida com relação às áreas de baixa endemicidade.

Strongyloides stercoralis

Doença: Estrongiloidíase.

Os vermes adultos vivem nas criptas de Lieberkühn, no intestino delgado de seres humanos. O ciclo de vida do parasito é muito peculiar, apresentando dois estágios distintos: vida livre e vida parasitária. No primeiro, os vermes adultos, machos e fêmeas, vivem no solo, reproduzem-se sexuadamente e produzem larvas. As larvas do terceiro estágio (L3), filariformes, são capazes de penetrar ativamente a pele do ser humano. Aquelas que não penetram a pele podem se tornar adultos de vida livre. Após a penetração, as larvas seguem pela via sanguínea até chegar ao pulmão, onde maturam. Durante este período podem levar a quadros de pneumonite e tosse produtiva. A partir daí, atingem o espaço alveolar, sobem pela traqueia, são deglutidas e chegam ao duodeno. As larvas evoluem então a vermes adultos, e ali as fêmeas produzirão ovos que irão maturar até larvas de primeiro estágio (L1). Essas larvas poderão sair nas fezes, sendo assim possível o diagnóstico. Uma vez no ambiente, a L1 evolui a L3 e o ciclo tem continuidade.

A infecção pode ser agravada em pessoas com hábitos pobres de higiene e/ou que permanecem em contato com as fezes por muito tempo, pelo uso de fraldas em pessoas deficientes e/ou crianças, por exemplo, ou ainda em pessoas que sofrem de constipação crônica. Nesses casos, as larvas atingem a maturidade quando ainda estão em contato com o indivíduo e podem penetrar sua pele novamente, agravando o quadro diarreico devido ao aumento do número de vermes no intestino, e ainda mantendo as manifestações pulmonares por período de tempo superior aos 15 dias habituais do ciclo pulmonar do *S. stercoralis*. A este quadro dá-se o nome de hiperinfecção.

Os quadros graves de infecção disseminada são especialmente observados em indivíduos que fazem uso de corticoides. Nesses casos a evolução de L1 para L3 é acelerada pelo fármaco, já que este mimetiza o hormônio que estimula as mudas de estágio das larvas. Assim, uma L1 se torna L3 infectante ainda no intestino do indivíduo. Existe risco aumentado de disseminação das larvas para outros órgãos, inclusive o cérebro, e a este quadro se dá o nome de "infecção disseminada". Durante o processo de hiperinfecção, em que as larvas perfuram o epitélio intestinal, há risco de desenvolvimento de sepse.

- **Infecção:** Penetração ativa das larvas filiformes pela pele.

Diagnóstico

Exame parasitológico das fezes pelo método de Baermann ou Rugai, para o isolamento de larvas. Estas medem entre 180 e 380 µm e devem apresentar esôfago dilatado em formato de pera e primórdio genital (Figura 45.10).

Figura 45.10 Larva rabditoide (L1) de *S. stercoralis*.
Fonte: Lenilza Mattos Lima. http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br.

Exame Sorológico: Elisa para a pesquisa de anticorpos IgG específicos. Entretanto, a sorologia positiva é um indicativo de contato com o parasito, não sendo possível discriminar infecção ativa de passada.

É possível também o diagnóstico pelo encontro de larvas (L1) a partir do líquido duodenal em casos de endoscopia ou biópsias e ainda o encontro de larvas (L3) em pacientes com tosse recorrente que eventualmente realizam exame de escarro ou de lavado brônquio-alveolar. Nesses casos, é importante o diagnóstico diferencial entre as larvas L3 de *Ascaris lumbricoides* e *Ancylostoma duodenale*, que também possuem ciclo pulmonar.

Além disso, no diagnóstico diferencial é importante a correlação clínico-laboratorial, em que se deve considerar que pacientes com estrongiloidíase apresentam como principal sintomatologia a má absorção intestinal e fezes diarreicas, duodenite e dor epigástrica.

Comentários

1. As fezes que não forem processadas rapidamente ou não contiverem agentes preservantes/fixadores podem conter as larvas L1 de ancilostomídeos, que eclodem em 48h horas. Assim, na identificação de larvas, deve-se observar as características morfológicas de cada espécie.
2. O exame parasitológico de fezes para a busca de larvas de *S. stercoralis* deve ser preconizado antes de qualquer terapia prolongada com corticoides, evitando os casos de hiperinfecção e infecção disseminada, que incluem casos de meningite por este parasito.

Taenia spp.

Doenças: Teníase e cisticercose (adulto e estágio larval respectivamente).

As tênias são animais platelmintos de corpo achatado e que possuem muitas segmentações que se destacam à medida que se tornam maduras. Estas são chamadas de proglotes. O verme adulto vive fixado no intestino delgado do hospedeiro definitivo, que é o ser humano, por meio do escólex. Esta é uma estrutura que possui quatro ventosas, ou ainda uma coroa de ganchos no caso de *T. solium*, e mede apenas um milímetro. O escólex é a única parte da tênia que adere a mucosa intestinal, assim não é comum que ocorram complicações na infecção intestinal. Ligado ao escólex fica o estróbilo, com centenas de proglotes que vão amadurecendo ao longo de seu desenvolvimento. As proglotes terminais são as proglotes grávidas, que contém centenas de ovos. Estas são infectantes e quando caem no solo podem ser ingeridas pelos hospedeiros intermediários, porco para a *T. solium* e bovino para *T. saginata*. Do ovo eclode uma larva, a oncosfera, que penetra a parede do intestino e por meio da corrente sanguínea é levada para musculatura esquelética, órgãos e tecidos. Nesses locais ocorre o encistamento dessa larva, que passa a se chamar cisticerco. O ser humano se infecta ao ingerir carne malcozida ou crua contendo o cisticerco, desenvolvendo assim a teníase.

O ser humano pode participar acidentalmente de outro momento do ciclo evolutivo do parasito, nesse caso adquirindo cisticercose, uma infecção que pode apresentar morbidade muito maior do que a teníase. A cisticercose ocorre quando o ser humano faz papel de hospedeiro intermediário da *T. solium*, ou seja, quando ingere os ovos produzidos pela tênia. A infecção se dá principalmente por autoinfecção, quando o indivíduo não possui boa higiene e contamina mãos e alimentos, e/ou quando as condições sanitárias são precárias e os esgotos acabam contaminando o solo e coleções hídricas que servirão posteriormente para consumo ou irrigação de hortaliças e frutas. Portanto, a cisticercose não se adquire pela ingestão da carne do porco, mas pela ingestão de alimentos contaminados com fezes humanas que contém os ovos da tênia.

No caso da infecção acidental humana, a larva que eclode do ovo e formará a larva encistada, o cisticerco, pode migrar e se desenvolver em qualquer parte do corpo humano. O cenário mais crítico é quando a infecção se estabelece no cérebro, levando a neurocisticercose. Nesse caso, a infecção causa uma encefalite cujo principal sintoma é a ocorrência de convulsões, podendo também acarretar mudança de comportamento, demência e depressão do nível de consciência. A neurocisticercose pode deixar sequelas graves irreversíveis, dependendo da região cerebral atingida.

Infecção

- **Teníase:** Ingestão de carne malcozida ou crua de porco (*T. solium*) e de bovino (*T. saginata*) contaminada com cisticerco.
- **Cisticercose:** Ingestão de alimentos contaminados com fezes humanas que contém ovos da tênia.

Diagnóstico

Teníase: Exame macroscópico – tamisação para identificação de proglotes, sendo que as principais características que diferenciam as espécies *T. solium* e *T. saginata* são o número de ramificações uterinas na proglote de *T. solium*, entre 7 e 13, e em *T. saginata*, entre 15 e 23. A identificação de proglotes poder ser realizada com o método do ácido acético glacial ou pela coloração com carmim ou tinta nanquim.

Exame parasitológico de fezes – os ovos podem ser encontrados nas fezes, sendo que as técnicas de concentração são recomendadas para a recuperação de ovos de *Taenia* spp.

Os ovos têm um diâmetro de 30 a 35 μm e são radialmente estriados (Figura 45.11). Frequentemente podem ser observados internamente alguns dos seis ganchos da oncosfera.

Não é possível diferenciar as espécies *T. solium* e *T. saginata* pelos ovos. Entretanto, podem-se observar algumas diferenças durante as infecções. No caso de infecção por *T. solium*, as proglotes são eliminadas passivamente nas fezes; nas infecções por *T. saginata*, são eliminadas independentemente das evacuações. Adicionalmente, é importante destacar que a teníase é quase sempre assintomática a não ser em casos raros de apendicite, colangite e pancreatite por causa da localização ectópica de proglotes.

Ao exame positivo para teníase, deve-se ressaltar o risco de autoinfecção para neurocisticercose, caso seja por *T. solium*. Deve-se ficar atento para histórico pessoal ou familiar de convulsões e demência.

Figura 45.11 Ovo de *Taenia* spp. Ganchos visíveis internamente.
Fonte: Carolina M. Veríssimo – Laboratório de Parasitologia da PUCRS.

Cisticercose: Exames sorológicos podem ser solicitados para detecção de anticorpos anticisticerco.

A correlação clínico-laboratorial nessa infecção é bastante importante, sendo que exames de imagens podem auxiliar no diagnóstico da cisticercose, principalmente tomografia, devendo-se observar cistos hipodensos com cerca de 1 cm, contendo uma larva pedunculada internamente.

Hymenolepis e *Dipylidium*

Outros cestódeos também podem ser encontrados em amostras de exame de fezes. As espécies de *Hymenolepis* spp. e *Dipylidium* são habituais de ratos e cães, respectivamente. Os adultos vivem no intestino delgado e podem ter 10 a 40 mm (*Hymenolepis nana*) ou 20 a 60 cm (*Hymenolepis* diminuta), e o *Dipylidium caninum* pode atingir até 70 cm. Os ovos são muito característicos, sendo possível visualizar os ganchos da tênia no interior do ovo. O que difere as espécies de *Hymenolepis* é o tamanho do ovo, medindo 70 a 85 µm por 60 a 80 µm o ovo de *H. diminuta*, e 30 a 50 µm o de *H. nana* (Figuras 45.12 e 45.13). Já os ovos de *Dipylidium* medem 35 a 40 µm e

Figura 45.12 Ovo de *Hymenolepis diminuta*.
Fonte: Lenilza Mattos Lima. http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br.

Figura 45.13 Ovo de *Hymenolepis nana*.
Fonte: Lenilza Mattos Lima. http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br.

estão envoltos por uma membrana que agrupa de 5 a 15 ovos no seu interior (Figuras 45.14).

Figura 45.14 Ovos de *Dipylidium caninum*. 8 ovos contidos pela mesma membrana.
Fonte: http://www.cdc.gov/dpdx/.

Trichuris trichiura

Doença: Tricuríase.

O *Trichuris* é um nematódeo que vive no intestino grosso de humanos. Os vermes adultos apresentam uma morfologia característica que lembra um "chicote" (ver capítulo de métodos), já que os vermes possuem a porção anterior do corpo mais delgada do que a posterior. Apresentam tamanho entre 3 e 4 cm de comprimento e 0,02 cm de largura.

O *T. trichiura* é um parasito dioico, os vermes vivem no ceco e os ovos liberados pelas fêmeas saem nas fezes e sofrem embriogênese no ambiente, após 15 a 30 dias, sendo por isso, chamados de geo-helmintos. O ser humano é infectado ao ingerir os ovos larvados do parasito, que podem estar em alimentos contaminados com fezes humanas. Ambientes onde não há tratamento de esgotos e estes são jogados nas coleções hídricas que posteriormente serão utilizadas para irrigação na agricultura podem ser uma fonte dessa infecção.

Após ingestão e passagem dos ovos pelos sucos gástricos, há a eclosão do ovo no intestino delgado e consequentemente a liberação da larva; esta migra pelo intestino até atingir o ceco, onde se torna verme adulto. Em 30 a 60 dias após ingestão já é possível o encontro de ovos nas fezes.

- **Infecção:** Ingestão e/ou inalação de ovos larvados.
- **Diagnóstico:** Exame macroscópico, que permite a visualização de vermes adultos (ver capítulo de métodos). Exame parasitológico das fezes e microscopia para o encontro de ovos (Figura 45.15). Os ovos medem entre 50 e 55 µm de comprimento e 20 e 25 µm de largura. Apresentam uma forma de barril com duas extremidades polares transparentes que lembram rolhas.

A tricuríase não apresenta sinais ou sintomas específicos, sendo essa infecção na maioria das vezes assintomática. Nos casos onde a infecção é maior, observa-se cólica abdominal, diarreia crônica, anorexia e apatia. Formas mais grave de hiperinfecção podem levar à morte. Nesses casos, os vermes são encontrados habitando outras regiões intestinais, podendo levar a quadros de apendicite aguda perfurada e prolapso retal.

Figura 45.15 Ovo de *Trichuris trichiura*.
Fonte: Alessandra L. Morassutti – Laboratório de Parasitologia da PUCRS.

Comentários

1. O prolapso retal, apesar de ser muito atrelado à infecção pelo *Trichuris*, é raro. Essa condição foi observada em cerca de 2% dos casos e, destes, 53% estavam relacionados à presença de mais de 100 mil ovos por grama de fezes (opg). O habitual em uma infecção corresponde a menos de mil opg.

AO EXAME DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS E LIQUOR

Wuchereria bancrofti

Doença: Filariose linfática, filariose bancroftiana, elefantíase (fase crônica).

A filariose linfática é causada por duas espécies de nematódeos, *Wuchereria bancrofti,* espécie encontrada no Brasil, e *Brugia malayi,* restrita a países asiáticos. Os vermes adultos dioicos vivem nos vasos linfáticos e linfonodos do ser humano, onde copulam e geram larvas, as microfilárias, que ficam circulantes no sangue, pelo qual é possível se fazer o diagnóstico da infecção. As fêmeas do mosquito do gênero *Culex* spp. têm hábito noturno e adquirem as microfilárias ao realizarem hematofagia. No mosquito, as larvas sofrem mudas e se tornam larvas infectantes, L3. O mosquito introduz as larvas no ser humano quando realiza nova hematofagia. As L3 depositadas no tecido penetram e atingem o sistema linfático, onde sofrem duas mudas e se tornam vermes adultos, produzindo novamente as microfilárias.

A filariose possui fases distintas com relação à sintomatologia que vão desde episódios agudos caracterizados por linfangite e linfangiectasia a complicações obstrutivas mais graves relacionadas à cronicidade da infecção, ocasionando linfadenites, quilúria, quilocele, linfedema e, por fim, a elefantíase, caracterizada pela disfunção linfática relacionada à morte dos vermes adultos e resposta inflamatória do hospedeiro.

- **Infecção**: Picada do mosquito *Culex* spp. infectado.
- **Diagnóstico:** Exame de sangue pelo método da gota espessa. O exame permite o encontro do parasito no sangue, as microfilárias. As larvas medem entre 240 e 300 µm e apresentam células que podem ser visualizadas individualmente e não se prolongam até a ponta da cauda (Figura 45.16). Para o aumento das chances de identificar as larvas no exame sanguíneo deve-se coletar a amostra de sangue durante a noite.

Figura 45.16 Larva de *Wuchereria bancrofti*. Gota espessa, corado com Giemsa. A seta evidencia ausência de núcleos na cauda.
Fonte: Alessandra L. Morassutti Laboratório de Parasitologia da PUCRS.

Resultados negativos no exame de gota espessa não necessariamente indicam que o paciente não está infectado, pois em indivíduos com baixa carga parasitária, ou em que já houve a morte dos vermes, as microfilárias podem não

ser encontradas. Assim, é fundamental que se faça a correlação clínico-laboratorial, onde os sinais e sintomas descritos acima devem ser considerados para o diagnóstico da filariose, além da consideração de proveniência e/ou visita a regiões endêmicas.

Exame sorológico: pesquisa de anticorpos e antígenos circulantes. Elisa e teste rápido (imunocromatográfico ICT AMRAD ICT, New South Wales, Australia Filariasis).

Comentários

1. A filariose bancroftiana vem recebendo atenção da Organização Mundial da Saúde para a erradicação da doença até 2020.
2. Atualmente a infecção no Brasil é restrita aos estados de Alagoas, Pará e Pernambuco.
3. Há que se considerar indivíduos provenientes, viajantes ou imigrantes de países africanos e asiáticos, onde *Wuchereria* também ocorre, além da possibilidade de infecção com a outra espécie, *Brugia malayi*.

Angiostrongylus cantonensis

Doença: Meningoencefalite eosinofílica, angiostrongilíase cerebral.

Duas espécies de *Angiostrongylus* habituais de roedores podem causar doenças em humanos. *Angiostrongylus costaricensis*, que coloniza as artérias mesentéricas do intestino e pode causar angiostrongilíase abdominal, e *A. cantonensis* (Figura 45.17), que pode causar meningoencefalite eosinofílica.

O ciclo de vida de ambas as espécies envolve dois tipos de hospedeiros: moluscos, lesmas, caracóis e caramujos, que são hospedeiros intermediários, e, no caso da espécie *A. cantonensis*, roedores como *Rattus norvegicus*, ratazanas, que são hospedeiros definitivos do parasito; já a outra espécie, *A. costaricensis,* tem por seu hospedeiro definitivo camundongos, principalmente *Oligoryzomys nigripes*, no sul do país. O ser humano participa do ciclo de ambas espécies acidentalmente, quando ingere larvas infectantes L3 presentes em moluscos crus ou malcozidos, em alimentos exóticos como *escargot,* ou em saladas e sucos onde o molusco infectado foi triturado acidentalmente. As L3 quando ingeridas penetram a parede do intestino e, através da corrente sanguínea, atingem o espaço subaracnóideo, no caso de *A. cantonensis*, podendo causar meningite e, mais raramente, encefalite e infecções oculares. No caso de *A. costaricensis*, as larvas migram para as artérias mesentéricas causando doença abdominal, podendo levar a apendicite aguda com perfuração.

A angiostrongilíase cerebral é caracterizada pela presença de eosinofilia acima de 4%, o que é incomum a outros agentes etiológicos de meningites como bactérias e vírus. Entretanto, esse achado não é o suficiente para o diagnóstico definitivo da infecção por *Angiostrongylus* porque outros helmintos, fungos e protozoários também podem levar ao aumento de eosinófilos. A meningoencefalite (quando além das meninges também há infecção encefálica) causada por *A. cantonensis* pode ser fatal em 3% dos casos, sendo que a maioria evolui para cura em 15 a 30 dias de tratamento. A infecção cerebral é acentuada pela movimentação das larvas, que causam lesões mecanicamente. A infecção pode deixar sequelas motoras, visuais e mentais, dependendo do local e intensidade das lesões deixadas pelas larvas.

O diagnóstico parasitológico é dificultado, pois são raros os casos em que as larvas são recuperadas no líquido cefalorraquidiano, ou globo ocular. No caso da infecção intestinal não é possível visualização das formas parasitárias nas fezes, pois as larvas são retidas devido a uma forte reação inflamatória. Assim, o diagnóstico é feito por meio da identificação do parasito em amostras de biópsia ou remoção cirúrgica (ver sessão 3 – Figura 45.24).

- **Infecção:** Ingestão de moluscos crus e/ou alimentos e água contaminados com larvas L3 do parasito.
- **Diagnóstico:** Parasitológico, pelo achado de larvas no liquor (raro). Podem ser encontradas larvas de vários estágios evolutivos, principalmente em infecções oculares nas quais estágios mais avançados, L4 e L5, podem ocorrer. Portanto os tamanhos variam entre 440 e 460 μm (L3) (Figura 45.18) até 16 mm (L5). Importante observar a projeção terminal na ponta da cauda das larvas (L3) e/ou os raios bursais nos machos (L4, L5) que é característico nas espécies de *Angiostrongylus* spp.
- Exames sorológicos: Elisa e Western blot com antígeno total de vermes fêmea.
- Exames moleculares: PCR em tempo real no liquor (amplificação da região ribossomal ITS1).

Em razão da dificuldade de diagnóstico diferencial das angiostrongilíases, é importante que se faça a relação clínico-laboratorial adequadamente na qual, além dos sintomas descritos acima, deve-se considerar o histórico de manipulação e/ou consumo de moluscos crus por parte do paciente.

Comentários

1. No Brasil a infecção causada por *A. costaricensis* parece endêmica no sul do País, mas já foi registrada nos estados de Minas Gerais, Brasília, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo.
2. A meningite eosinofílica causada pelo *A. cantonensis* foi diagnosticada pela primeira vez no Brasil em 2007; antes, a infecção era restrita aos países do sudeste asiático. Em vários estados brasileiros já foram relatados casos humanos e/ou encontrados hospedeiros infectados, servindo de alerta para um iminente aumento da ocorrência desta parasitose no Brasil.
3. As larvas L1 que saem nas fezes do rato não são capazes de estabelecer infecção em humanos, são infectantes apenas para moluscos.
4. Na infecção humana por ambas as espécies não há perpetuação, uma vez que os ciclos de vida dos parasitos são interrompidos ou por não haver eliminação de L1 nas fezes ou pela morte das formas juvenis devido a resposta imunológica do hospedeiro. O homem, portanto, é considerado hospedeiro acidental.

Figura 45.17 Verme fêmea adulto de *Angiostrongylus cantonensis.*
Fonte: Carolina M. Veríssimo – Laboratório de Parasitologia da PUCRS.

Figura 45.18 Larva L3 de *A. cantonensis.* A seta indica o entalhe final da cauda característico.
Fonte: Carolina M. Veríssimo – Laboratório de Parasitologia da PUCRS.

■ AO EXAME DE MATERIAL DE BIÓPSIAS, PUNÇÕES E ESCARRO

Schistosoma mansoni, Wuchereria bancrofti, Taenia spp., *Angiostrongylus costaricensis*

Como mencionado nas sessões sobre *S. stercoralis*, *A. lumbricoides* e ancilostomídeos, faz parte do ciclo evolutivo a maturação das larvas no pulmão. Durante essa passagem, podem haver sintomas de tosse produtiva. Existe a possibilidade de diagnóstico, mesmo que não intencional, pelo achado destas larvas no lavado brônquio-alveolar, bem como em amostras de escarro (Figura 45.19). É possível ainda o encontro de larvas de *S. stercoralis* pela análise do líquido duodenal por endoscopia ou Entero-test. As larvas podem ser visualizadas em microscópio após coloração com hematoxilina-eosina (HE) e/ou Giemsa (Figura 45.20).

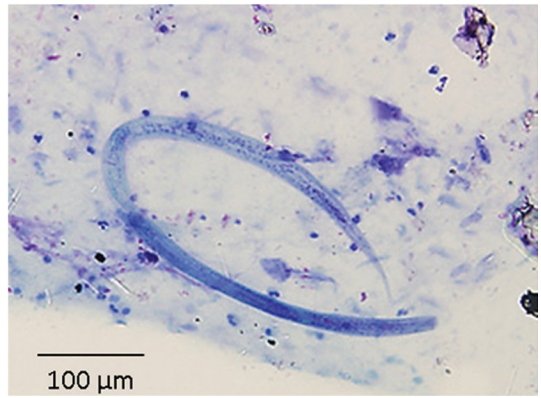


Figura 45.19 Larva de *S. stercoralis* em lavado brônquio-alveolar. Corado com Giemsa.
Fonte: cdc.gov/dpdx.

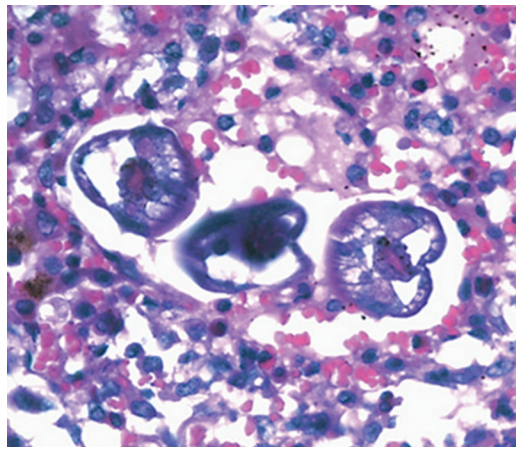


Figura 45.20 Larva de *A. lumbricoides* em corte transversal em biópsia de pulmão. Corado com HE.
Fonte: cdc.gov/dpdx.

No caso da infecção por *Schistosoma mansoni*, muitos dos ovos que são eliminados pelas fêmeas na luz dos capilares mesentéricos acabam não atingindo a luz intestinal e são retidos em órgãos adjacentes. As complicações associadas a esquistossomose são justamente aquelas em decorrência do acúmulo de ovos em órgãos e tecidos. A maioria dos ovos fica retida no fígado, mas os rins e até mesmo o cérebro podem ser acometidos, causando esquistossomose ectópica. Casos de mielorradiculopatias já foram descritos tendo como agente etiológico ovos de *S. mansoni* que atingiram a medula espinhal. Nestes

casos, o diagnóstico é feito pela análise de material de biópsia. Os ovos (Figura 45.21) frequentemente se encontram circundados por células inflamatórias que formam granulomas, que são estruturas enrijecidas pela deposição de colágeno e fibrina. Muitas vezes o processo inflamatório em que se encontram os ovos leva à degeneração e consequente deformidade das características diagnósticas (Figura 45.22). Nesses casos a sorologia ou mesmo a detecção de ácidos nucleicos pode ser necessária. No entanto, este último não está disponível comercialmente, sendo restrito a alguns centros de pesquisa.

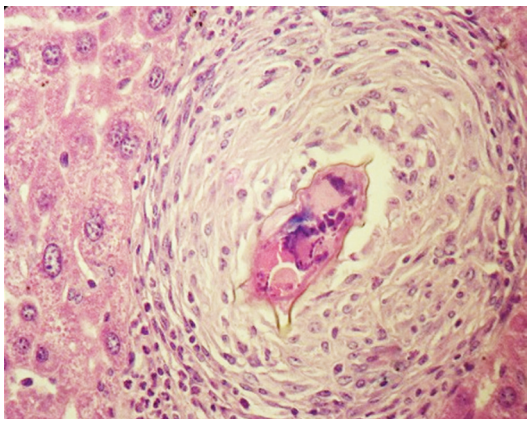


Figura 45.21 Ovo de *Schistosoma mansoni* em corte histológico. Material de biópsia de fígado corado com HE.
Fonte: Alessandra L. Morassutti – Laboratório de Parasitologia da PUCRS.

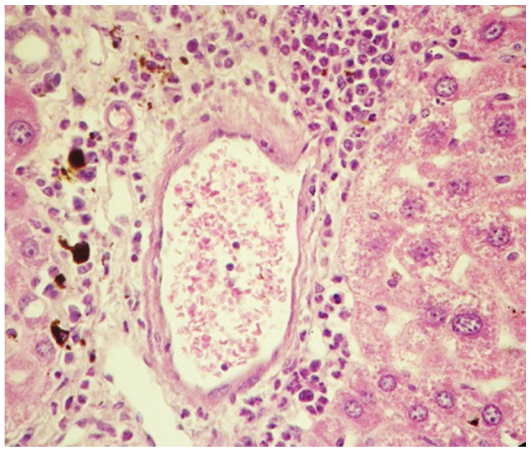


Figura 45.22 Ovo de *Schistosoma mansoni* em corte histológico. Material de biópsia de fígado corado com HE.
Fonte: Alessandra L. Morassutti – Laboratório de Parasitologia da PUCRS.

Em materiais de biópsia, onde houve comprometimento linfático, (obstrução linfática e/ou linfadenites) podem ser encontrados vermes adultos de *Wuchereria bancrofti*. Nesses casos, dificilmente será possível o encontro de microfilárias no sangue (Figura 45.16), pois a obstrução dos vasos pode estar atrelada à reação inflamatória fibrótica devido à morte dos vermes. Assim, podem ser encontrados vermes degenerados nos linfonodos biopsiados.

Proglotes de tênias podem eventualmente ficar retidas em regiões intestinais, causando inflamação que pode evoluir para complicações mais graves, como apendicite perfurada. Nesses casos, serão visualizados ovos nas peças removidas por cirurgia ou biópsias (Figura 45.23). Outros casos de apêndice perfurado ou ressecção intestinal podem estar atrelados à presença do parasito *Angiostrongylus costaricensis*, mencionado na sessão 2.2. São frequentemente diagnosticados casos de angiostrongilíase abdominal no estado do Rio Grande do Sul, em achados pós-cirúrgicos ou em material de biópsias. O verme adulto de *A. costaricensis* (Figura 45.17) vive nas artérias mesentéricas e causa uma

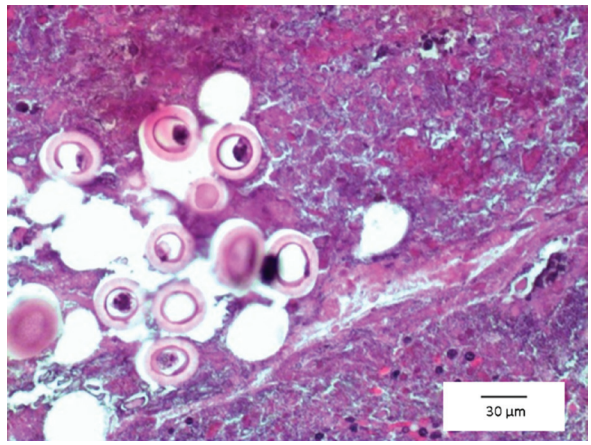


Figura 45.23 Ovos de *Taenia* spp. na luz apendicular. HE.
Fonte: Rubens Rodriguez – Instituto de Patologia de Passo Fundo-RS.

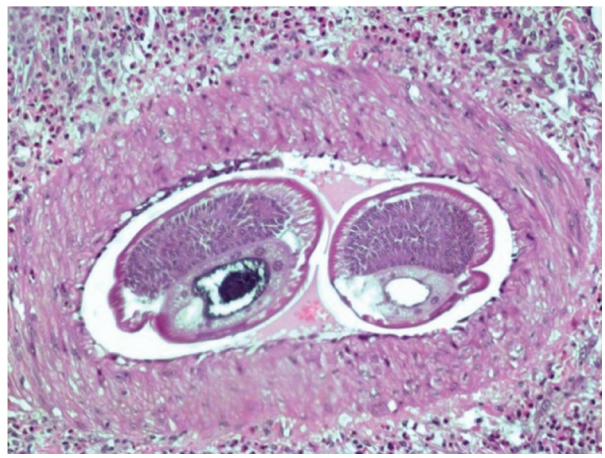


Figura 45.24 Verme adulto de *Angiostrongylus costaricensis* na luz da artéria apendicular. HE 100×.
Fonte: Rubens Rodriguez – Instituto de Patologia de Passo Fundo-RS.

reação inflamatória intensa, granulomatosa perivascular e vasculite eosinofílica, lesões intestinais caracterizadas por infarto, pseudo tumor ou apendicite aguda. As lesões são causadas pela presença dos vermes, mas mais intensamente pela presença dos ovos e das larvas que precisariam atravessar o vaso e chegar à luz intestinal. Devido a esta reação inflamatória, os ovos ficam retidos e podem acometer outros órgãos, como o fígado, levando a uma hepatite eosinofílica. Mais raramente, pode haver acometimento dos testículos, omento e em hérnia de parede abdominal. O diagnóstico é baseado em achados característicos de nematódeos em corte transversal: presença de dois tubos reprodutores e um tubo digestivo, quando fêmeas (Figuras 45.24) e apenas um tubo reprodutor e digestivo, quando macho. O fato de o verme estar dentro da artéria caracteriza angiostrongilíase.

Material de biópsia a partir de cistos pode revelar diferentes etiologias. Os cistos da cisticercose, ou cisticercos, podem ser encontrados em qualquer órgão ou tecido; frequentemente o tecido cerebral é acometido, causando neurocisticercose. Exames de imagem, como tomografia computadorizada, revelam cistos hipodensos com pedúnculo esbranquiçado (a larva cisticercoide), e ao corte histológico é possível visualizar as várias camadas do parênquima. As características do cisto em corte são a presença de camadas filamentosas que parecem pregas (Figura 45.25).

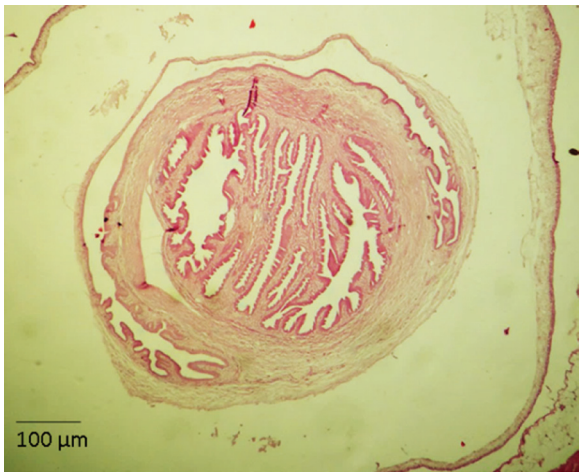


Figura 45.25 Cisticerco de *Taenia solium* em corte transversal, corado com HE.
Fonte: Carolina M. Veríssimo – Laboratório de Parasitologia da PUCRS.

Echinococcus granulosus

Doença: Hidatidose.

O *Echinococcus* spp. é uma tênia que vive no intestino dos seus hospedeiros definitivos, os cães. O ser humano participa do ciclo de forma acidental no papel de hospedeiro intermediário, que naturalmente seriam ovelhas e bovinos. Os ovos da tênia são liberados nas fezes dos cães e contaminam o ambiente. Ovinos e bovinos ingerem os ovos durante a pastagem e o ser humano se infecta ao ingerir alimentos contaminados com fezes de cães, ou pelo contato direto com o cão, pois as proglotes podem ficar presas ao pelo do animal. Após a ingestão e a passagem dos ovos pelo estômago há a eclosão do ovo, e a larva penetra a mucosa intestinal e migra via corrente sanguínea para potencialmente qualquer órgão. Na maior parte das vezes a larva coloniza o fígado, depois, em menor proporção, o pulmão, e mais raramente outros órgãos, podendo inclusive atingir o cérebro, causando hidatidose cerebral.

A partir da larva presente no tecido, ocorre a produção do cisto hidático, que é revestido por três membranas. A membrana mais interna, germinativa, produz um líquido cristalino que preenche o cisto e também produz as formas larvares por brotamento, os protoescólex, que são infectantes ao cão, quando alimentados com as vísceras dos ovinos e bovinos, completando assim o ciclo.

A hidatidose está presente em locais que tem como atividade econômica a criação de ovinos e bovinos de maneira tradicional, com o auxílio de "cães de pastoreio" ou "ovelheiros". Na América do Sul a prevalência é alta, principalmente na Argentina, no Uruguai e no Brasil, destacando-se os estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Minas Gerais.

- **Infecção:** Ingestão de alimentos contaminados com fezes de cães infectados pelo *Echinococcus granulosus*.
- **Diagnóstico:** A infecção é diagnosticada principalmente por exames de imagem, quando se encontra cistos hipodensos que podem variar de tamanho dependendo do tempo de desenvolvimento. A análise de líquido puncionado pode revelar a presença das larvas protoescólex que apresentam forma característica, com a visualização dos ganchos da tênia (Figura 45.26).

Figura 45.26 Protoescólex de *Echinococcus granulosus*, obtido de punção de cisto hidático.
Fonte: Alessandra L. Morassutti – Laboratório de Parasitologia da PUCRS.

Adicionalmente, é importante fazer a correlação clínico-laboratorial procedendo à análise parasitológica, pelo exame de amostras líquidas provenientes de material de punção. Identificação de protoescólex, que se apresenta como uma estrutura globulosa medindo aproximadamente 450 por 300 μm, com ventosas e ganchos da tênia visíveis internamente.

- **Exame sorológico:** busca a presença de anticorpos específicos anti-hidátide

Comentários

1. Abcessos hepáticos podem ter origens etiológicas diferentes. O caso mais frequente é a infecção bacteriana. Entretanto, já foram encontrados abcessos hepáticos dos quais a prima origem era por *Echinococcus*, e somente após a morte do cisto evidenciou-se infecção bacteriana secundária.
2. Em caso de ruptura acidental do cisto (como, por exemplo, uma batida forte por acidente de carro, ou prática de certos esportes), as larvas apresentam potencial de originar novos cistos, causando múltiplas leões (cistos secundários). Por isso, o tratamento cirúrgico deve ser precedido de tratamento com injeção de solução saturada de cloreto de sódio, ou solução de hipoclorito, para eliminar o risco de contaminação (técnica de PAIR).

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Andrade AM, Perez Y, Lopez C, *et al*. Intestinal Obstruction in a 3-Year-Old Girl by Ascaris lumbricoides Infestation: Case Report and Review of the Literature. Medicine (Baltimore). 2015;94(16).
2. Atlas de parasitologia clínica e doenças infecciosas associadas ao sistema digestivo. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.parasitologiaclinica.ufsc.br/index.php/info/conteudo/fotografias/
3. Azira N MS, Zeehaida M. Severe chronic iron deficiency anemia secondary to Trichuris dysentery syndrome - a case report. Trop Biomed. 2012;29(4):626-31.
4. Brunetti E, Kern P, Vuitton DA. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. Acta Trop. 2010;114(1):1-16.
5. Caldeira K, Teixeira CF, Silveira MB, et al. Comparison of the Kato-Katz and Helmintex methods for the diagnosis of schistosomiasis in a low-intensity transmission focus in Bandeirantes, Paraná, southern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107(5):690-2.
6. Centers for disease control and prevention. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.cdc.gov
7. Chirapongsathorn S, Kamath PS. Iron-Deficiency Anemia With an Itch. Mayo Clin Proc. 2015;90(10):1458.
8. Fontes G, Leite AB, de Lima AR, et al. Lymphatic filariasis in Brazil: epidemiological situation and outlook for elimination. Parasit Vectors. 2012;26(5):272.
9. Gryseels B. Schistosomiasis. Infect Dis Clin North Am. 2012;26(2):383-97.
10. Lee KW, Suhk HC, Pai KS, et al. Diphyllobothrium latum infection after eating domestic salmon flesh. Korean J Parasitol. 2001;39(4):319-21.
11. Morassutti AL, Thiengo SC, Fernandez M, et al. Eosinophilic meningitis caused by Angiostrongylus cantonensis: an emergent disease in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109(4):399-407.
12. Nkouawa A, Dschanou AR, Moyou-Somo R, et al. Seroprevalence and risk factors of human cysticercosis and taeniasis prevalence in a highly endemic area of epilepsy in Bangoua, west Cameroon. Acta Trop. 2017;165:116-20.
13. Rizvi G, Rawat V, Pandey HS, et al. Acute abdomen: An uncommon presentation of a common intestinal nematode. Trop Parasitol. 2015;5(2):123-6.
14. Rodriguez EA, Abraham T, Williams FK. Severe strongyloidiasis with negative serology after corticosteroid treatment. Am J Case Rep. 2015;18(16):95-8.

46

capítulo

Alessandra Loureiro Morassutti ▪ Lenilza Mattos Lima ▪
Renata Russo Frasca Candido ▪ Tiana Tasca

Procedimentos Técnicos em Parasitologia

EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES

Considerações gerais

O exame parasitológico de fezes é fundamental quando o paciente apresenta sintomas de infecção no trato gastrintestinal, pois muitas das infecções gastrintestinais são causadas por helmintos ou protozoários. A maioria dessas parasitoses é diagnosticada quando formas parasitárias são encontradas nas fezes, como vermes adultos inteiros e/ou segmentos de tênias, ovos e larvas de helmintos, cistos, trofozoítos e oocistos de protozoários. Contudo, outros materiais biológicos também podem ser utilizados no diagnóstico de enteroparasitoses, tais como escarro, urina, raspado anal, conteúdo duodenal e biópsia.

Quanto à consistência, as fezes são classificadas em formadas ou moldadas, pastosas, diarreicas ou líquidas. Os trofozoítos são usualmente diagnosticados nas fezes diarreicas ou líquidas, nas mucosanguinolentas e ocasionalmente nas fezes pastosas, enquanto os cistos são encontrados mais comumente em fezes formadas e também nas pastosas. Os oocistos são diagnosticados em todos os tipos de fezes, sendo encontrados em maior quantidade em fezes diarreicas. Os ovos e as larvas de helmintos geralmente podem ser diagnosticados em todos os tipos de fezes.

As fezes normais contêm restos alimentares, elementos celulares, resíduos de origem vegetal e animal, e bactérias; são formadas e cilíndricas, de cor castanha, pH entre 6,5 e 7,5, e normalmente são liberadas entre 100 e 150 g de fezes por dia.

Na rotina do exame parasitológico de fezes sempre devem ser incluídas técnicas de concentração para a pesquisa das estruturas parasitárias. A seguir, são apresentados os principais métodos e técnicas empregados no diagnóstico laboratorial de parasitoses intestinais.

Etapas do exame parasitológico de fezes

Coleta das fezes

A coleta de fezes deverá ser realizada, preferencialmente, em dias alternados, coletando-se três amostras no total. A evacuação da amostra deve ser feita diretamente em um frasco ou em um jornal ou papel limpo e transferida para um recipiente de plástico com tampa de rosca. A identificação correta do parasito depende de características morfológicas típicas de cada espécie, sendo, portanto, necessária a preservação adequada da amostra fecal antes e após o exame macroscópico.

Preservação das fezes

As amostras fecais que não forem entregues imediatamente ao laboratório deverão ser preservadas. É importante a preservação da amostra fecal a fim de evitar a embriogênese de ovos e desenvolvimento de larvas, bem como a integridade morfológica dos trofozoítos, cistos e oocistos dos parasitos. A preservação temporária pode ser feita com a refrigeração das fezes (4°C a 10°C), evitando a ocorrência de putrefação. O tempo máximo de refrigeração é de 72 horas, entretanto, as larvas de helmintos morrem e podem sofrer alterações morfológicas. A fixação permanente pode ser realizada com a adição de solução de formaldeído a 5% ou 10% em água destilada-deionizada, ou solução tamponada. Outros conservantes permanentes de protozoários e helmintos estão descritos no Quadro 46.1. É recomendado misturar uma parte de fezes para duas ou três partes da solução conservadora.

Quadro 46.1 Principais soluções utilizadas como conservantes de material fecal.

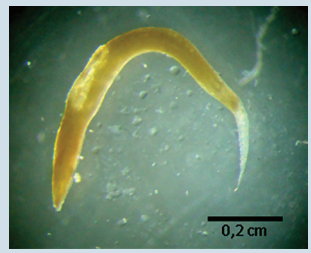
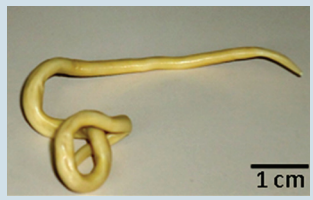
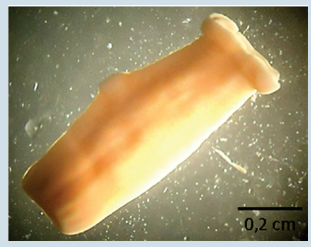
- **Solução de MIF** (Mertiolato-Iodo-Formaldeído): 2% de Glicerina, 10% de formaldeído PA, 80% de mertiolato (Timerasol 1:1000), dissolvidos em água destilada-deionizada. Acrescentar 6% da solução de Lugol imediatamente antes do uso. (Coutinho substituiu o mertiolato pelo mercurocromo a 0,2%.)
- **Solução SAF** (Acetato de Sódio-Ácido Acético-Formaldeído): 1,5% de acetato de sódio; 2% de ácido acético glacial; 4% de formaldeído PA, dissolvidos em água destilada-deionizada.
- **Fixador APV** (Álcool Polivinílico): indicado para cistos e trofozoítos. O fixador de Schaudinn é tóxico por conter na composição cloreto de mercúrio-II.
- **Fixador de Schaudinn modificado**: contém álcool etílico, ácido acético, glicerina e
- sulfato de cobre ($CuSO_4.5H_2O$). O cloreto de mercúrio-II foi substituído pelo sulfato de cobre.
- **Fixador PAF** (Fenol-Álcool-Formaldeído): contém fenol (23 mL), solução salina a 0,85% (825 mL), álcool etílico a 95% (125 mL) e formaldeído (50 mL).

Fonte: Cortesia de Alessandra Morassutti – Laboratório de Parasitologia da PUCRS.

Exame macroscópico das fezes

O exame macroscópico das fezes deve sempre ser realizado e anteceder o exame microscópico. Esse procedimento é importante para a verificação de elementos anormais da consistência, como a presença de pus, muco ou sangue, e para a identificação de vermes adultos e de proglotes eventualmente liberados nas fezes. Pode ser feito através de simples observação ou pela tamisação. O Quadro 46.2 sumariza os principais helmintos encontrados no exame macroscópico.

Quadro 46.2 Espécies de helmintos que podem ser encontradas no exame macroscópico das fezes.

Espécie	Tamanhos aproximados comprimento × diâmetro (cm)	Coloração e características	Imagem
Enterobius vermicularis	0,8 – 1,3 × 0,03	Cor branca; a fêmea é encontrada principalmente na região do períneo e tem extremidade posterior afilada; o macho tem extremidade posterior recurvada ventralmente. Podem ser encontrados na superfície das fezes. Imagem de exemplar fêmea de *E. vermicularis*.	
Ascaris lumbricoides	15 – 35 × 0,5	Cor clara; apresenta estrias circulares; a fêmea tem extremidade posterior romba e o macho tem extremidade posterior recurvada ventralmente. Imagem de exemplar fêmea de *A. lumbricoides*.	
Taenia saginata e *Taenia solium (Proglotes)**	1,5 – 2 × 0,5 – 1	Cor branca; é encontrado na superfície das fezes ou pode ser eliminado espontaneamente no caso de *T. saginata*.	

* A identificação da espécie é feita através do número e tipo de ramificações uterinas. A *Taenia solium* possui entre 7 e 13 ramificações de cada lado do tronco central do útero (tipo dendrítico), enquanto a *Taenia saginata* apresenta 15 a 20 ramificações uterinas (tipo dicotômico).

Fotos: Cortesia de Alessandra L. Morassutti – Laboratório de Parasitologia da PUCRS.

Exame microscópico das fezes

O exame microscópico permite a visualização de ovos e larvas de helmintos e cistos, oocistos e trofozoítos de protozoários. A seguir são apresentados os principais métodos empregados no diagnóstico de formas parasitárias intestinais. O Quadro 46.3 mostra um resumo das principais técnicas parasitológicas recomendadas para protozoários e helmintos.

Método direto

Esse método é considerado de baixa sensibilidade, já que nesse exame não há concentração das formas parasitárias. O exame a fresco é mais utilizado em fezes diarreicas ou líquidas quando há suspeita de infecção por trofozoítos de protozoários. Tendo em vista que os trofozoítos não sobrevivem muito tempo e que a observação da motilidade é importante para o diagnóstico, as fezes devem ser examinadas dentro de 15 a 30 minutos. Este método também pode ser utilizado para a busca de cistos, oocistos de protozoários, larvas e ovos de helmintos.

- **Técnica:** colocar duas a três gotas de solução salina 0,85 % em uma lâmina de vidro. Com um palito, toca-se a amostra fecal em diferentes pontos, transferindo porções desta para a lâmina e cobrindo a preparação com uma lamínula. Examinar ao microscópio com aumento de 100× e 400×.

Técnica de sedimentação espontânea (Lutz, 1919; Hoffmann, Pons e Janer, 1934)

Essa técnica baseia-se na sedimentação espontânea de ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários em água, ocorrendo a concentração dos mesmos. Os ovos considerados pesados, como os ovos inférteis de *Ascaris*, ovos de *Schistosoma mansoni* e de *Taenia* spp. são facilmente recuperados. A técnica é conhecida como "HPJ".

- **Técnica:** colocar cerca de 2 g de fezes (fixadas ou não) colhidas de várias partes da amostra fecal em um frasco de Borrel ou similar e dissolver em cerca de 25 mL de água. Acrescentar 50 mL ou mais de água e filtrar com gaze dobrada duas vezes (ou com filtro descartável Parasitofiltro®) para um copo cônico de sedimentação com capacidade de 200 mL. O copo deve ser preenchido com água até três quartos de sua capacidade. A amostra é deixada de 2 a 3 horas em repouso (ou no máximo até 24h). Poderá haver um procedimento de lavagem do sedimento após o repouso de 2 a 3 horas, decantando com cuidado o sobrenadante e adicionando igual volume de água, deixando novamente em repouso por uma hora. Este procedimento de lavagem pode ser repetido até que o sobrenadante fique claro. O material sedimentado é coletado de diferentes partes do fundo

Quadro 46.3 Principais técnicas parasitológicas recomendadas para protozoários e helmintos intestinais.

Método	Cistos e oocistos	Larvas	Adultos e ovos de helmintos	Ovos		
	Protozoários	*Strongyloides*	*Enterobius* e proglote de *Taenia* spp.	*Ascaris*, *Trichuris* e Fasciola	Ancilostomídeos e *Hymenolepis*	*Schistosoma mansoni*
Sedimentação espontânea	✓	✓		✓		✓
Kato-Katz				✓	✓	✓
Faust	✓				✓	
Ritchie	✓			✓		
Willis					✓	
Fita adesiva			✓			
Gradiente Salino				✓		✓
Baermann-Moraes		✓				
Rugai, Mattos e Brisola		✓				
Helmintex*						✓

*Método utilizado para diagnóstico de esquistossomose em áreas de baixa endemicidade e pós-tratamento.

Fonte: Cortesia de Alessandra Morassutti – Laboratório de Parasitologia da PUCRS.

do copo com a ajuda de uma pipeta de vidro ou pipeta de Pasteur. Colocar uma a duas gotas de sedimento sobre lâmina, adicionar uma gota da solução de Lugol, misturar e cobrir com lamínula. Examinar ao microscópio com aumento de 100× e 400×.

Para a pesquisa de *Blastocystis* spp. recomenda-se diluir as fezes frescas em solução salina.

Método de Kato-Katz (Katz, 1960; Katz, Chaves e Pellegrino, 1972)

Esse método é recomendado para a pesquisa de ovos de alguns helmintos, e tem como objetivo correlacionar a produção de ovos com a carga parasitária das espécies *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, ancilostomídeos (*Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*) e *Schistosoma mansoni*.

- **Técnica:** 40 a 50 mg de fezes frescas são pressionadas através de uma tela metálica ou de náilon, e recolhidas para o orifício de um cartão colocado sobre a lâmina de vidro. O cartão é então removido, e uma lamínula de celofane embebida em solução de verde de malaquita e glicerina é depositada em cima do material fecal na lâmina. Inverter e pressionar a lâmina sobre o papel absorvente, até que a massa cubra a área da lamínula. O processo de clarificação dura cerca de duas horas à temperatura ambiente. Examinar a preparação ao microscópio com aumento de 100×.

Para a quantificação de ovos nas fezes devem ser analisadas três lâminas, e a média de ovos encontrados nestas três lâminas deverá ser multiplicada pelo fator 24, obtendo-se então o número de ovos por grama de fezes.

Técnica de Faust (Faust e colaboradores, 1938)

Essa técnica baseia-se em centrífugo-flutuação de cistos, oocistos e ovos em solução de sulfato de zinco de densidade 1,18 g/mL (33 g%). É um método de concentração para cistos de protozoários presentes em pequena quantidade nas fezes e para ovos leves como os de ancilostomídeos e de *Hymenolepis* sp. Convém salientar que ovos considerados pesados, como os de *S. mansoni*, *Taenia* spp. e ovos inférteis de *A. lumbricoides*, podem frequentemente não ser evidenciados por esse método. Para fezes preservadas a densidade deverá ser ajustada em 1,20 g/mL.

- **Técnica:** dissolver uma a duas gramas de fezes coletadas de várias partes da amostra fecal, em 10 mL de água. Filtrar a suspensão em gaze dobrada duas vezes. Colocar o filtrado em um tubo de centrífuga de 15 mL e centrifugar por um a dois minutos a 650 × *g*. Decantar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em água, completando o volume de dois terços da capacidade do tubo. Centrifugar e repetir novamente a lavagem até que o sobrenadante fique límpido. Quando o último sobrenadante é desprezado, ressuspender o sedimento e completar o volume de 12 mL com sulfato de zinco 33% e novamente centrifugar por um minuto a 650 × *g*. O tubo é cuidadosamente retirado da centrífuga e colocado em posição vertical. Com a ajuda de uma alça de platina (ou de arame), tocar o centro da película superficial e recolher o material contido na alça transferindo para uma lâmina de vidro (três a quatro alçadas). Adicionar uma gota de Lugol, misturar, cobrir com lamínula e examinar ao microscópio com aumento de 100× e 400×.

Técnica de Ritchie (Ritchie, 1948)

A técnica consiste em centrífugo-sedimentação de cistos, oocistos, ovos e larvas pela formalina-éter ou formalina-acetato de etila. É um método de concentração para recuperar cistos e oocistos de protozoários em fezes frescas.

- **Técnica:** dissolver uma a duas gramas de fezes coletadas de várias partes da amostra fecal em 10 mL de água. Filtrar a suspensão em gaze dobrada duas vezes. Colocar o filtrado em um tubo de centrífuga de 15 mL e centrifugar por um a dois minutos a 650 × *g*. Decantar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em água, completando o volume de dois terços da capacidade do tubo. Centrifugar e repetir novamente a lavagem do sedimento até que o sobrenadante fique límpido. Quando o último sobrenadante é desprezado, ressuspender o sedimento com um mL de formalina a 10% (de preferência em solução tamponada, pH 7) e completar o volume até 10 mL. Deixar em repouso por cinco minutos. Após, acrescentar dois a três mL de éter ou acetato de etila, tapar o tubo e agitar vigorosamente por 30 segundos. Centrifugar por um minuto a 500 × *g*. Após a centrifugação quatro camadas distintas são formadas, sendo que o sedimento contém as formas parasitárias. Remover com cuidado o anel de gorduras e detritos das paredes do tubo, com o auxílio de uma agulha histológica ou estilete fino e decantar as três camadas superiores. Pode-se usar um *swab* de algodão para remover o restante de detritos na parede do tubo. Usar o líquido remanescente para suspender o sedimento no fundo ou adicionar uma gota de Lugol, misturar e, com uma pipeta de Pasteur, colocar uma a duas gotas de sedimento corado sobre a lâmina; cobrir com lamínula e examinar ao microscópio com aumento de 100× e 400×.

Para a pesquisa de *Blastocystis* spp. recomenda-se diluir as fezes frescas em solução salina.

Técnica de centrífugo-sedimentação para material fecal preservado- MIFC

As fezes preservadas em solução MIF podem ser processadas pela técnica MIFC, que é uma técnica de centrífugo-sedimentação semelhante à de Ritchie, onde o fixador MIF substitui a formalina. Atualmente, essa técnica também pode ser usada com fezes preservadas em solução fixadora SAF.

- **Técnica:** homogeneizar bem as fezes contidas na solução conservante. Filtrar a suspensão com gaze dobrada duas

vezes (ou com filtro descartável Parasitofiltro®), e colocar cerca de 10 mL do filtrado em tubo de centrífuga com capacidade de 15 mL. Adicionar três mL de éter ou acetato de etila, fechar o tubo e agitar vigorosamente por 30 segundos. Centrifugar durante um minuto a 500 × *g*. Desprezar o sobrenadante e o anel formado por gorduras e resíduos (as três camadas superiores), ficando somente com o sedimento formado no fundo do tubo. Limpar com *swab* de algodão as paredes do tubo, quando necessário. Colher uma a duas gotas do sedimento, colocar em lâmina, adicionar uma a duas gotas de Lugol, cobrir com lamínula e examinar ao microscópio com aumento de 100× e 400×.

Técnica de Willis (Willis, 1921)

A técnica consiste na flutuação em solução saturada de cloreto de sódio em água (densidade 1,20 g/mL), para a busca de ovos considerados leves, como os de ancilostomídeos e os de *Hymenolepis* sp.

- **Técnica:** dissolver uma a duas gramas de fezes coletadas de vários pontos do bólus fecal, em pequeno frasco de vidro com 20 mL de solução saturada de cloreto de sódio, até obter uma total homogeneização. Em seguida, completar o volume com a referida solução até a borda do frasco. Colocar uma lâmina em contato com o menisco durante 30 a 45 minutos. Retirar a lâmina e invertê-la rapidamente, cobrir com lamínula e examinar ao microscópio com aumento de 100×.

Método de Baermann (1917) e Moraes (1948)

Esse método baseia-se no termo-hidrotropismo positivo das larvas de nematoides em temperatura de 40ºC a 45ºC. É indicado para o diagnóstico de larvas de *S. stercoralis*, de ancilostomídeos e larvas de outros helmintos.

- **Técnica:** colocar 8 a 10 g de fezes recentemente emitidas e não preservadas sobre a gaze com duas dobras (ou filtro descartável Parasitofiltro®), cuidadosamente colocada na boca de um funil de vidro com um tubo de borracha na extremidade inferior, e uma pinça de Mohr. Encher o funil de vidro com água aquecida entre 40 e 45ºC, ficando as fezes submersas. Aguardar uma hora, e abrir a pinça de Mohr para a coleta do material em um vidro de relógio e examinar ao microscópio estereoscópio. Outra maneira é colher o líquido em tubo de centrífuga, centrifugar a 500 × *g* durante 1 minuto, e examinar ao microscópio (100× e 400×) o sedimento corado com Lugol entre lâmina e lamínula.

Método de Rugai, Mattos e Brisola

O método baseia-se no termo-hdrotropismo positivo das larvas de nematóides, em temperatura de 42 ºC a 45 ºC.

- **Técnica:** estender a gaze dobrada duas vezes sobre a abertura do frasco contendo as fezes frescas não preservadas. Colocar o material assim preparado no interior de um cálice de sedimentação com aproximadamente 100 mL de água na temperatura de 40 ºC a 45 ºC. A água deve alcançar toda a extensão da abertura do frasco. Deixar em repouso por 60 minutos. Após, colher o sedimento no fundo do cálice com auxílio de uma pipeta, e examinar ao microscópio (100× e 400×) o sedimento corado com Lugol entre lâmina e lamínula.

Método de Gradiente Salino (Coelho e colaboradores, 2009)

O método inicialmente foi desenvolvido por Rowan e Gram (1959) e Ritchie e Berrios-Duran (1961) para a busca de ovos de helmintos, modificado para a recuperação de ovos de *Schistosoma mansoni*. Utiliza um dispositivo simples baseado na sedimentação diferencial dos ovos quando estes são submetidos a um fluxo lento e contínuo de solução salina 3% por meio de uma placa porosa, criando uma separação através de gradiente. Os ovos permanecem na superfície da placa porosa e o sedimento final é transferido para uma lâmina e visualizado ao microscópio.

Método de Helmintex (Teixeira et al., 2007)

A técnica é altamente sensível para o isolamento de ovos de helmintos baseado na interação dos ovos com microesferas magnéticas.

- **Técnica:** 30 g de fezes passam pelo método de sedimentação espontânea. Após a clarificação do sobrenadante, transferir o sedimento para uma tela com abertura 100 *mesh*, depois para a tela de 200 *mesh* e por último para a tela de 325 *mesh* (onde os ovos são retidos). Remover o material retido na última tela, virando-a em um copo de sedimentação e lavando com água o fundo da tela pela face contrária onde estão os ovos. Deixar sedimentando novamente por 30 minutos a uma hora. Remover o sobrenadante e colocar três mL do sedimento em tubo de centrífuga de 15 e 3 mL de acetato de etila, centrifugar por 10 minutos a 1.000 × *g*. Remover com cuidado o tampão de detritos das paredes do tubo com o auxílio de uma agulha histológica ou estilete fino. Pode-se usar um *swab* de algodão para remover o restante de detritos da parede do tubo. Cerca de um mililitro remanescente é transferido para um microotubo e acrescentado 19 microlitros de microesferas super paramagéticas; levar ao homogenizador por 30 minutos; deixar os microtubos em contato com o imã por três minutos. Remover o sobrenadante ao inverter o imã com os microtubos abertos. Preparar lâminas e analisar ao microscópio. É o método parasitológico mais sensível para detecção de ovos de *Shistosoma mansoni*, alcançando 100% de sensibilidade com o limite de até 1,3 ovos por grama de fezes.

Colorações para o exame microscópico

Soluções de iodo

As soluções de iodo são utilizadas para evidenciar os núcleos e as estruturas internas dos cistos de protozoários, e também para a identificação de larvas de helmintos.

Coloração pela solução de iodo de Dobell e O'Connor

Preparo:

- Iodo, cristais - 1 g
- Iodeto de potássio - 2 g
- Água destilada-deionizada - 100 mL

Dissolver o iodeto de potássio em água. Adicionar os cristais de iodo e misturar até completa dissolução. Filtrar e armazenar em frasco cor âmbar. Preparar novas soluções depois de 10 a 14 dias.

Coloração pela solução de iodo de lugol

Preparo:

- Iodo, cristais ..... 5 g
- Iodeto de potássio ..... 10 g
- Água deionizada ..... 100 mL

Dissolver o iodeto de potássio em água. Adicionar os cristais de iodo e misturar até completa dissolução. Filtrar e armazenar em frasco cor âmbar. Preparar novas soluções depois de 10 a 14 dias. Antes do uso, a solução deve ser diluída na proporção de 1:5 em água destilada-deionizada.

Colorações permanentes para protozoários

Coloração pela hematoxilina-férrica de Heidenhain (Ferreira, 2003)

A técnica é utilizada para a identificação de cistos e trofozoítos, e para confirmação das espécies.

Soluções:

a) **Solução de Schaudinn**
Solução saturada de cloreto de mercúrio em água destilada ..... 80 mL
Álcool etílico 95% ..... 20 mL
Ácido acético ..... 3 mL

b) **Solução de iodo**
Álcool etílico 95% ..... 98 mL
Tintura de iodo 2% ..... 2 mL

c) **Solução do mordente-diferenciador**
Alúmen de ferro (sulfato de amônio férrico) ....2 g
Água destilada ..... 98 mL

d) **Solução de hematoxilina**
Hematoxilina .....0,30 g
Água destilada ..... 100 mL

- **Técnica:** Em lâminas limpas, preparar esfregaços finos e, enquanto ainda molhados, mergulhar em solução de Shaudinn por, ao menos, um minuto. Lavar as lâminas com água corrente três vezes. Mergulhar as lâminas em álcool (70% a 95%). Para remover resíduos de mercúrio remanescentes, colocar as lâminas em solução de iodo por um minuto, e então em álcool (70% a 95%) por um minuto. Lavar em água corrente três vezes. Colocar as lâminas na solução de mordente por 30 segundos. Lavar com água corrente quatro ou cinco vezes. Colocar as lâminas na solução de coloração por três a cinco minutos. Lavar com água corrente três vezes. Se a diferenciação for necessária, imergir rapidamente as lâminas na solução de mordente-diferenciador e então lavar com água corrente três a cinco vezes. Desidratar por imersão em álcool (70% a 95%) por cerca de dois minutos, e então em álcool 95%, e então duas vezes em álcool absoluto (dois minutos cada vez). Mergulhar em xileno antes de montar a lâmina.
- **Observação:** O último passo pode ser dispensado quando as lâminas forem examinadas durante rotina diagnóstica. Uma montagem rápida pode ser obtida adicionando-se uma gota de glicerina entre o esfregaço e a lamínula.

Coloração pelo tricrômico

A técnica é utilizada para a identificação de cistos e trofozoítos, e para confirmação das espécies.

Corante:

- *Chromotrope* 2R ..... 0,6 g
- *Light green* SF ..... 0,3 g
- Ácido fosfotúngstico ..... 0,7 g
- Ácido acético glacial ..... 1 mL
- Água destilada-deionizada ..... 100 mL

Colocar os componentes secos em um béquer e adicionar 1 mL de ácido acético glacial. Agitar a mistura e deixar em repouso 30 minutos para amadurecer. Adicionar 100 mL de água. O corante é estável e não deve ser diluído. Apresenta uma cor púrpura forte, quase preta.

Solução de álcool-ácido: misturar 99,5 mL de etanol 90% e 0,5 mL de ácido acético glacial.

- **Técnica:** as fezes preservadas em fixador SAF são filtradas em gaze dobrada duas vezes (ou em Parasitofiltro®), e o filtrado colocado em tubo de centrífuga de 15 mL. Centrifugar a 500 × *g* por um minuto; decantar o sobrenadante e preparar o esfregaço fecal com o sedimento em lâmina (0,5 a 1 mL). Deixar secar. Após, o esfregaço é submetido a uma sequência de passos para coloração: álcool etílico a 70% por cinco minutos; álcool etílico a 70% por cinco minutos; álcool etílico a 70% por dois a cinco minutos; corante tricrômico por 10 minutos; solução álcool etílico a 90%, acidificado com solução de 1% de ácido acético por três segundos; lavar com álcool etílico absoluto; álcool etílico absoluto por dois a cinco minutos; álcool etílico absoluto por dois a cinco minutos; Xilol ou Toluol por dois a cinco minutos; Xilol ou Toluol por dois a cinco minutos. Montar a lâmina em bálsamo do Canadá ou resina sintética, deixar secar e examinar ao microscópio óptico com objetiva de imersão.

Método modificado de Kinyoun a frio

A técnica é utilizada para coloração de oocistos de coccídeos intestinais. Pode ser usada amostra de fezes frescas ou preservadas com formol a 10% ou SAF.

Soluções:

a) **Corante de Kinyoun**
Solução A: Fucsina básica .....4 g
Álcool etílico 95% ..... 20 mL
Solução B: Fenol fundido.....8 g
Água destilada..... 10 mL

Misturar as duas soluções e aguardar por 24h antes do uso.

b) **Solução ácool-ácido:** misturar 97 mL de etanol 95% e 3 mL ácido sulfúrico concentrado.

c) **Solução de azul de metileno**: dissolver 0,3 g de cloreto azul de metileno em 100 mL de etanol a 95%.

- **Técnica:** Preparar o esfregaço em lâmina com fezes frescas ou preservadas e deixar secar em temperatura ambiente. Fixar com álcool metílico por um minuto e deixar novamente para secar a temperatura ambiente. Adicionar ao esfregaço o corante de Kinyoun por três a cinco minutos e então, lavar com água corrente. Diferenciar com solução álcool-ácido por dois minutos. Lavar a lâmina com água corrente por alguns segundos. Corar o fundo com solução alcoólica de azul de metileno a 0,3% por um minuto. Após, lavar com água corrente e secar a lâmina a temperatura ambiente ou em estufa a 35 ºC. Montar com resina sintética para visualização ao microscópio óptico com objetiva de imersão.

Método da safranina modificada

Método utilizado para a busca de oocistos de coccídeos intestinais.

Soluções:

a) **Solução aquosa de safranina a 1%**
Safranina..... 1 g
Etanol..... 30 mL
Água deionizada ..... 70 mL

Dissolver a safranina no etanol. Adicionar o álcool aos poucos e, após, adicionar a água. Agitar durante uma hora (agitador magnético). Filtrar após 24h.

b) Solução aquosa de azul de metileno a 1%: dissolver 1 g de azul de metileno em 100 mL de água destilada-deionizada.

- **Técnica:** um esfregaço da amostra fecal é realizado após a etapa de fixação e concentração do sedimento. A lâmina com o esfregaço é mergulhada em uma solução aquosa de safranina 1% e aquecida no micro-ondas por 30 segundos. Após lavagem com água corrente, o esfregaço é mergulhado em solução aquosa de azul de metileno a 1% e montado com resina sintética para observação ao microscópio óptico com objetiva de imersão.

MÉTODO DA FITA ADESIVA (GRAHAM, 1941)

O método é indicado para a pesquisa de ovos e parasitos adultos de *Enterobius vermicularis* presentes nas regiões anal e perianal. Ocasionalmente podem ser encontrados ovos de *Taenia* spp., *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*. A coleta do material deve ser realizada pela manhã, antes de o paciente fazer a higiene.

- **Técnica:** um pedaço de fita adesiva transparente é fixado ao fundo de um tubo de hemólise com a parte colante voltada para fora. A prega anal do paciente é aberta e o lado adesivo é encostado diversas vezes na região perianal. A fita é então colocada sobre uma lâmina com a face gomada voltada para baixo, tomando-se o cuidado de esticá-la bem, evitando a formação de pregas e bolhas de ar. Examinar a lâmina ao microscópio com aumento de 100× e 400×. Se os ovos não forem encontrados na região central da fita, deve-se examinar toda a fita adesiva. Pode-se usar uma espátula com a fita adesiva presa na extremidade da espátula (parte gomada da fita voltada para fora).

MÉTODO DO ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL

O método é indicado para a identificação de proglotes de *Taenia* spp..

Método: em uma placa de Petri colocar a proglote submersa em ácido acético glacial durante 15 a 20 minutos, para clarificação e dissolução do revestimento calcário. Após esse tempo, comprimi-la entre duas lâminas e examinar sob iluminação as ramificações internas da proglote.

EXAME PARASITOLÓGICO DO SANGUE

A identificação específica dos parasitos do sangue (hemoparasitos) é realizada por esfregaços sanguíneos delgados ou finos (gota estendida) e esfregaços espessos (gota espessa) corados pelo método de Giemsa ou de Leishman. É recomendada a combinação de ambos os esfregaços para melhores resultados. Tendo em vista uma parasitemia baixa e consequente resultado negativo, recomendam-se vários esfregaços, em intervalos de 8 a 12 horas, durante dois a três dias. Procedimentos de concentração do sangue são recomendados, especialmente para o isolamento e concentração de tripanossomos, leishmanias e microfilárias.

- **Esfregaço sanguíneo delgado:** a colheita do sangue deve ser feita no pico febril, por punção da polpa do dedo (parasitos da malária) ou punção venosa, sem anticoagulante. Os esfregaços sanguíneos feitos com anticoagulantes devem ser confeccionados em até 30 minutos, para se evitar alterações morfológicas dos parasitos. Preparar duas lâminas para cada paciente.
  Os esfregaços finos devem ser fixados com metanol antes da coloração.
- **Gota espessa (método de Walker):** baseia-se na desemoglobinização do sangue, com a ruptura dos glóbulos vermelhos e posterior coloração pelo Giemsa. A gota espessa propicia uma concentração 20 vezes maior que o esfregaço fino e, portanto, maior sensibilidade na de-

tecção dos parasitos. No entanto, para identificação das espécies do gênero *Plasmodium*, muitas vezes é necessário fazer o esfregaço fino para estudo morfológico do parasito e das hemácias.

Técnica

- Colher cerca de duas gotas de sangue em lâmina, por punção de polpa digital, após assepsia local com álcool iodado.
- Desfibrinar a gota de sangue com o canto de uma outra lâmina.
- Deixar secar em temperatura ambiente.
- Corar com Giemsa.
- Secar. Observar com objetiva de imersão.

Comentários

1. Preparar pelo menos duas gotas espessas.
2. A densidade da gota não pode ser muito espessa nem muito fina.
3. O desfibrinamento impede a coagulação do sangue e garante a necessária aderência do sangue à lâmina durante a coloração.
4. Nunca fixe com metanol os esfregaços espessos.
   - **Corante Giemsa:** deve ser preparado no dia do uso. Preparar uma solução de Giemsa a 3% em água tamponada destilada, pH 7,2, o qual fornece melhores resultados de coloração.
   - **Coloração:** corar com Giemsa durante 15 a 20 minutos; desprezar o corante; lavar com água destilada; secar e observar com objetiva de imersão.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013. Diagnostic Procedures. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticProcedures/index.html
2. Coelho PMZ, Jurberg AD, Oliveira AA, et al. Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:720-3.
3. De Carli GA. Parasitologia Clínica. Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2011.
4. Eurico C, Litton E. Exames Parasitológicos. 3.ed. Fortaleza: Brasil Tropical, 1999.
5. Ferreira CS. Technical report. Staining of intestinal protozoa with Heidenhain's iron hematoxylin. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2003;45(1):43-4.
6. Hoffman WA, Pons JA, Janer JI. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. Puerto rico J Publ Hlth. 1934;9:281-98.
7. Katz N, Chaves A, Pellegrino JP. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1972;14:397-400.
8. Kawamoto F, Mizuno S, Fujioka H, et al. Simple and rapid staining for detection of Entamoeba cysts and other protozoanwith fluorochrome. J Med Sc Biol. 1987;40:35-46.
9. Lutz AO. Schistosomum mansoni e a schistosomose, segundo observações feitas no Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1919;11:121-55.
10. Neves DP. Parasitologia humana. 12.ed. São Paulo: Atheneu, 2011.
11. Pessoa SB, Martins AV. Parasitologia Médica. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
12. Rey L. Parasitologia. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
13. Teixeira CF, Neuhauss E, Bem R, et al. Detection of Schistosoma mansoni eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. PLoS Negl Trop Dis. 2007;1:e73.

47

capítulo

Alessandra Loureiro Morassutti ▪ Alexandre Januário da Silva

Diagnóstico Imunológico e Molecular

O diagnóstico baseado na análise dos caracteres morfológicos de alguns parasitos é o suficiente para garantir acurácia. No entanto, em algumas situações é possível determinar apenas o gênero do parasito; por exemplo, no caso de infecções com *Cryptosporidium*, onde morfologicamente não se pode discernir entre *C. parvum, C. hominis* e *C. felis*, cuja diferenciação ao nível de espécie é um importante indicador epidemiológico. Nos casos de identificação morfológica, muitas vezes é a experiência do analisador que poderá atestar a ocorrência das diferentes espécies; entretanto, mesmo contando com profissionais bem treinados, as características morfológicas podem ter sido perdidas, seja pela administração de fármacos, pela própria ação do sistema imune e consequente morte do parasito, ou acondicionamento das amostras. Existem ainda certas condições que impossibilitam o encontro do parasito nas amostras clínicas, seja pela carga parasitária baixa ou intermitência da liberação dos estágios diagnósticos formas, bem como métodos de concentração e/ou coloração inadequados.

Esses problemas podem, em parte, ser resolvidos com métodos indiretos de detecção pela sorologia, onde se investiga por meio de métodos imunológicos a presença de moléculas de anticorpo "específicas" que são geradas em resposta à infecção. A Tabela 47.1 apresenta os principais testes comercialmente disponíveis e suas respectivas técnicas imunológicas aplicadas no diagnóstico em parasitologia.

A palavra "específicas" aqui merece ressalva. A maioria dos testes imunológicos são desenvolvidos baseados na resposta imune de indivíduos "sadios" e infectados, ou doentes. No entanto, há que se pensar no que exatamente se define como indivíduos sadios. Na verdade, são considerados sadios aqueles indivíduos que não apresentam sintomas daquela doença que se está estudando/desenvolvendo o teste diagnóstico. Da mesma forma, os doentes são aqueles que apresentam sintomatologia compatível ou, num panorama ideal, são efetivamente diagnosticados pelo encontro das formas parasitárias características e, neste caso, configuram os controles positivos do teste.

Dificilmente se leva em consideração o "histórico imunológico" do indivíduo, ou seja, a pessoa pode já ter entrado em contato com determinado antígeno, produzir anticorpos, mas nunca ter desenvolvido sintomas. Assim, às vistas do pesquisador, este indivíduo é considerado sadio (pois não apresenta sintomas), mas na verdade sua sorologia será positiva, já que seu sistema imunológico entrou de fato em contato com aquele patógeno. Também pode aparecer reação positiva, pois o antígeno apresenta epitopos que são compartilhados com moléculas de organismos filogeneticamente próximos. É o que acontece no diagnóstico de algumas helmintíases, por exemplo a reação cruzada que pode ocorrer entre toxocaríase e estrongiloidíase.

A resposta imunológica de um indivíduo pode ser diferente da de outro, e o que configura uma molécula antigênica pode não causar exatamante a mesma resposta em outro indivíduo, e este será negativo no teste. Ainda, dependendo do formato do teste, por exemplo, testes sorológicos baseados na detecção de IgG, os achados sorológicos podem não ser capazes de discriminar quando a infecção é passada ou ativa, o que pode acarretar diagnósticos inconclusivos.

Além disso, existe a "janela imunológica". O tempo que levaria desde a exposição do patógeno até a produção de anticorpos a um nível detectável. O que poderia levar duas a quatro semanas em alguns casos. Esta característica dos testes imunológicos apresenta uma limitação muito grande para o diagnóstico, principalmente em infecções agudas, prejudicando o tratamento, e/ou em situações de transplante de órgãos ou transfusões sanguíneas, em que o patógeno pode ser transmitido para outro indivíduo sem nem mesmo ter tido tempo de provocar a reação imunológica (detectável) no doador.

O uso da biologia molecular trouxe avanços, nesse sentido, para o diagnóstico laboratorial, principalmente com técnicas de amplificação de DNA, detecção de antígenos circulantes utilizando anticorpos monoclonais, testes diagnósticos desenvolvidos com proteínas recombinantes e, ainda, a possibilidade de se empregar plataformas múltiplas para diagnóstico concomitante. Inicialmente eram restritas aos centros de pesquisa, mas hoje fazem parte das rotinas de triagem de bolsas de sangue e começam a ganhar espaço em laboratórios de rotina clínica.

Tabela 47.1 Principais testes disponíveis para o diagnóstico imunológico em parasitologia.

Organismo/infecção	Nome do teste/local	Tipo de teste
Angiostrongilíases	*Angiostrongylus* IgG/PUCRS	ELISA/WB
Cisticercose	Cisticercose-Quantitativa IgG/IgM	ELISA
	Neurocisticercose no liquor-IgG	ELISA/WB
Cryptosporidium spp.	Crypto CELISA	EIA
	PARA-TECT™ *Cryptosporidium* Antigen 96	EIA
	ProSpecT Rapid	EIA
	ProSpecT	EIA
	Cryptosporidium	EIA
	Cryptosporidium	EIA
	Crypto CEL	IFA
	XPect Crypto	Rapid
Cryptosporidium spp./*Giardia duodenalis*	PARA-TECT™ *Cryptosporidium*/Giardia DFA 75	DFA
	Giardia/*Cryptosporidium* QUIK CHEK	Rapid
	Merifluor	DFA
	ProSpecT	EIA
	Crypto/Giardia CEL	IFA
	ColorPAC*	Rapid
	ImmunoCard STAT!*	Rapid
	Xpect	Rapid
Cryptosporidium spp./*Giardia duodenalis*/ *Entamoeba histolytica*/*dispar*	Tri-Combo Parasite Screen	ELISA
	Alere Triage® Micro Parasite Panel	Rapid
Echinococcus granulosus	*Echinococcus*, Anticorpo IgG-soro	ELISA/WB
Entamoeba histolytica	*Entamoeba* CELISA	EIA
	E. histolytica	EIA
	E. histolytica II	EIA
Entamoeba histolytica/*E. dispar*	ProSpecT	EIA
	E. histolytica QUIK CHEK™	Rapid EIA
Giardia duodenalis	*Giardia* CELISA	ELISA
	PARA-TECT™ *Giardia* Antigen 96	EIA
	ProSpecT	EIA
	Giardia II	EIA

(*Continua*)

Tabela 47.1 Principais testes disponíveis para o diagnóstico imunológico em parasitologia. *(Continuação)*

Organismo/infecção	Nome do teste/local	Tipo de teste
Giardia duodenalis	*Giardia*	EIA
	GiardiaEIA	EIA
	Giardia CEL	IFA
	ProSpecT	Rapid
	Simple-Read *Giardia*	Rapid
Leishmaniose	*Leishmania*, Anticorpo IgG-soro	IFA
Malária	Quantimal™ pLDH Malaria CELISA	Rapid
	BinaxNOW® Malaria Test	EIA
	Malaria-Ag	EIA
	OptiMal	Rapid
	MAKROmed malaria test	Rapid
	Paracheck Pf	Rapid
	Visitect Malaria Pf	Rapid
	Malaria Antigen (HRP2) CELISA	EIA
	Malaria IFA Screen QUEST	IFA
Toxocaríase	*Toxocara* IgG CELISA	EIA
	Toxocara canis, Anticorpo IgG	ELISA
Toxoplasma gondii	*Anti-Toxoplasma* IgG/IgM	IFA/Qml
	Avidez de igg/toxoplasmose	EIA
Trichomonas vaginalis	T. Vag	DFA
	Quik-Trich	LA
Trypanosoma cruzi	*T. cruzi* IgG CELISA	EIA
	Chagas IgG/IgM	IFA
Schistosoma mansoni	POC-CCA	Rapid
	Anticorpo-AntiIgG	ELISA
Strongyloides stercoralis	*Strongyloides stercoralis*, Anticorpo IgG	EIA
Wuchereria bancrofti	ICT Filariasis	Rapid
	Tropbio Og4C3 Filariasis Antigen	ELISA
	Filariasis Ag-CELISA	EIA
	Filariasis Antibody (Bm14) CELISA	EIA

EIA – Enzyme immunoassay; IFA – Immunofluorescence Antibody Assay; DFA – Direct fluorescent antibody; Qml – quimiluminescência; Rapid – Immunochromatographic test; WB – Western Blot.

Fonte: Adaptada de CDC.gov.

ELISA – (*ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY*)

O exame de Elisa é uma técnica muito utilizada, que pode ser aplicada para detecção de antígenos ou de anticorpos presentes na amostra clínica. A técnica baseia-se na adsorção da molécula alvo, podendo ser um antígeno específico ou um anticorpo, em poços de reação de uma placa de poliestireno onde é aplicada a amostra clínica. A molécula complementar ao alvo (imunoglobulina, no caso de ter sido adsorvido o antígeno) ou antígeno (no caso de ter sido adsorvido um anticorpo) liga-se de forma covalente e não será mais desligada. Usa-se, então, para revelar a ligação, uma molécula específica que tenha afinidade apenas para aquela molécula que estava presente na amostra clínica e que foi capturada na primeira reação, e. Essa molécula frequentemente é um anti-anticorpo conjugado a uma enzima, como a peroxidase ou fosfatase alcalina, que tem atividade enzimática sobre um substrato que possa servir como indicador da reação. Esse anticorpo é normalmente uma molécula de imunoglobulina produzida em animal de laboratório que reconhece a porção conservada do anticorpo humano (porção "Fc") (chamado de anticorpo secundário). Assim, não importa a região hipervariável da imunoglobulina (que é específica ao alvo do teste); qualquer que seja o alvo, a molécula de imunoglobulina terá sempre a mesma região conservada e esta será reconhecida pelo anticorpo secundário conjugado a uma enzima. O uso de um anticorpo conjugado a uma enzima é que dá o nome à técnica, isto é, *enzyme linked immunosorbent assay* (ensaio de enzima ligada a um reagente imunoezimático). Após a ligação do anticorpo conjugado à enzima, a mesma será capaz de agir sobre um substrato específico, que será adicionado então à placa de Elisa. Como esta está ligada especificamente ao anticorpo secundário e este só estará na amostra se o anticorpo primário (amostra clínica) tiver reconhecido a molécula alvo, só será considerada positiva a ligação em que a atividade enzimática é observada.

Os ensaios de Elisa são úteis também para quantificação da reação, já que são usados espectrofotômetros capazes de detectar diferenças de absorbância gerados entre o limiar de detecção dos controles negativos e de especificidade (*cut-off*). De modo que o resultado é representado em números maiores ou menores "que", assim, títulos altos são relacionados com a quantidade de imunoglobulinas e/ou antígenos presentes na amostra.

WESTERN-BLOT – WB

O WB é uma técnica muito semelhante ao Elisa ; utiliza o mesmo princípio imunoenzimático, porém as moléculas alvo são inicialmente separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com base nos seus respectivos pesos moleculares e, posteriormente, transferidas para uma membrana de nitrocelulose ou de fluoreto de polivinilideno. Neste caso, não será utilizado espectrofotômetro para leitura da reação colorimétrica, e sim a posição específica de onde ocorreu a reação de cor. A posição específica da molécula na membrana, que se apresenta na forma de uma banda, corresponde ao respectivo peso molecular do antígeno identificado. Assim, mesmo que haja ligação inespecífica ao antígeno (em regiões, bandas diferentes) apenas uma ou, às vezes, algumas bandas são aquelas consideradas diagnósticas. No caso da necessidade de quantificação, são necessários controles internos de expressão gênica para correlação, bem como equipamentos sensíveis de análise fotométrica.

A vantagem do WB é a especificidade. Um determinado antígeno pode apresentar sensibilidade alta quando utilizado em Elisa, porém baixa especificidade se o reconhecimento pela imunoglobulina acontecer em qualquer parte da molécula. Já no WB, mesmo que haja reconhecimento inespecífico em outras regiões do antígeno, isto é, outras bandas separadas pelos seus respectivos pesos moleculares, será reconhecida a porção da molécula que é a diagnóstica. Ou seja, somente quando esta porção for reconhecida a amostra será considerada positiva, mesmo que tenha havido reconhecimento em outras partes inespecíficas (Figura 47.1).

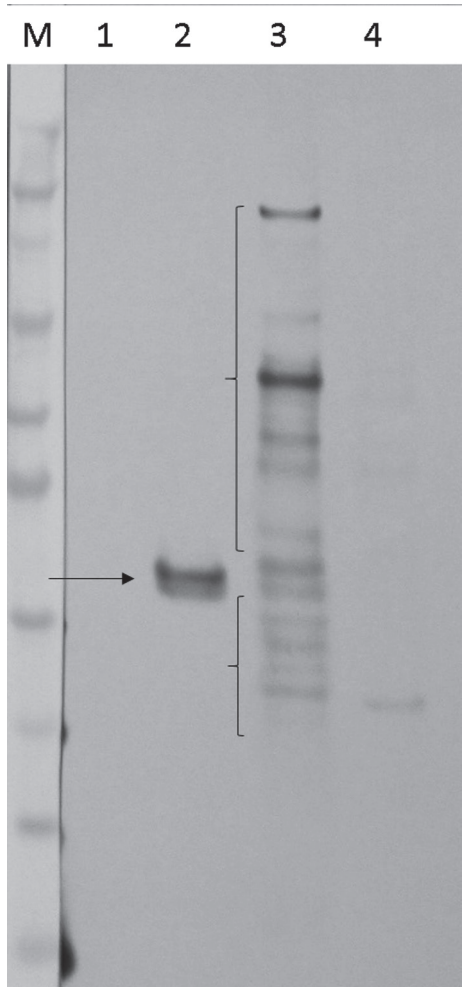


Figura 47.1 Western blot evidenciando banda específica para o diagnóstico (flecha) e bandas inespecíficas em amostra clínica (chaves).
M: marcador de massa molecular em kDa; 1-amostra negativa; 2- controle positivo; 3- amostra clínica positiva com marcações inespecíficas e 4- amostra clínica negativa com marcações inespecíficas.

PCR

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tem sido aplicada no diagnóstico de muitas infecções parasitárias, a partir de amostras biológicas variadas, desde fezes, urina, sangue, líquor, secreções, tecido etc. É uma técnica *in vitro* que aproveita as propriedades de replicação celular para amplificar (aumentar) a quantidade de DNA (ou RNA) específicos em uma dada amostra. As condições metodológicas variam de acordo com a sequência alvo (molde) e podem incluir uma ou mais reações subsequentes (Nested-PCR). Utiliza como alvo frequentemente sequências do DNA ribossomal ou genes mitocondriais que possuam características discriminativas entre espécies. O grande desafio para que a PCR seja específica é a escolha/desenho dos iniciadores de reação, ou *primers*. Os *primers* são moléculas de DNA de fita única sintetizadas em laboratório que podem conter entre 15 e 22 nucleotídeos complementares a uma região específica de um gene ou um segmento de ácido nucleico presente no genoma de um organismo. Essas regiões complementares aos *primers* são os alvos genéticos que se tem interesse em amplificar.

A sequência do *primer* é importante, porque, se esta não for específica, ou seja, não reconhecer apenas a sequência alvo, ela poderá gerar resultados falso-positivos. Um exemplo seria a utilização de uma sequência de DNA que amplifique um gene, ou parte dele, como a actina, que é uma proteína de citoesqueleto comum a todas as células de eucariotos e que tem sequências bem conservadas entre diferentes organismos. Assim, virtualmente, qualquer DNA presente na amostra poderia ser amplificado, inclusive do próprio paciente. Portanto, para o laboratório que esteja interessado em implementar na rotina um novo exame de PCR, é muito importante que se avalie como o teste foi desenvolvido e se o teste foi avaliado com um número apropriado de controles com alta diversidade que proporcione a determinação de certos parâmetros de *performance* do teste, como a sensibilidade e especificidade.

A técnica de PCR já foi proposta para o diagnóstico de muitas parasitoses, de tal forma que é possível encontrar proposições de *primers* e protocolos diferentes para identificação de um mesmo parasito. É importante observarmos quais desses testes já foram utilizados na rotina clínica. A Tabela 47.2 apresenta exemplos de testes utilizados e/ou reconhecidos pelo Centro de Diagnóstico e Controle de Doenças dos Estados Unidos (*Centers for Disease Control and Prevention* – CDC).

No diagnóstico de malária, por exemplo, a PCR possibilitou a identificação distinta das espécies de *Plasmodium* associadas à malária humana em várias situações que limitam o uso da microscopia: 1 - nos casos em que há baixa carga parasitária; 2 - nos casos em que as características morfológicas das espécies se sobrepõem, especialmente nas infecções de *P. vivax* e *P. ovale*; 3 - nos casos de infecções mistas. As espécies são reconhecidas pelo tamanho do produto de PCR amplificado, visualizado em um gel de agarose 2%, sendo *P. vivax* 120 pb; *P. malariae* 144 pb; *P. falciparum* 205 pb; e *P. ovale* 800 pb (CDC.gov/dpdx/malária).

Tabela 47.2 Principais parasitoses e testes moleculares disponíveis.

Teste	Fezes	Sangue	Liquor	Tecido
PCR convencional	1; 8	3; 7; 10	5; 9	6; 2
PCR de tempo real	8	10	5; 4	4
LAmp	1			
Chip-casset		1		
Hibridização *in situ*				2

1 – Esquistossomose; 2 – Leishmaniose; 3 – Babesiose; 4 – Amebas; 5 – *Angiostrongylus cantonensis;* 6 – *Angiostrongylus costaricensis*; 7 – Chagas; 8 – Criptosporidiose; 9 – Cisticercose; 10 – Malária.

Fonte: Acervo dos autores.

PCR DE TEMPO REAL (REAL-TIME PCR)

Nesse procedimento, o material genético utilizado pode ser DNA ou RNA, e se baseia na medição em tempo real de fluorescência a cada ciclo de amplificação, o que permite obter resultados quantitativos relativos a um padrão previamente estabelecido. Já foram desenvolvidas diferentes tecnologias para a detecção de amplificação de DNA em tempo real, dentre elas se destacam duas tecnologias largamente utilizadas:

1. **SYBR Green:** nessa tecnologia utiliza-se um corante assimétrico de cianina, o SYBR Green (N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene) methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine), que naturalmente se incorpora às fitas duplas de ácidos nucleicos, e muito fracamente às fitas simples. O complexo ácido nucleico-corante resultante absorve a luz azul em 497 nm e emite luz verde fluorescente a 520 nm. Assim, a cada ciclo de amplificação da PCR existe a medição, em tempo real, do nível de fluorescência em escala exponencial, até que se atinja o nível máximo, chamado de platô. O nível de fluorescência corresponderá à quantidade de ácido nucleico amplificado, nesse caso DNA, em cada ciclo. De tal forma que, quanto menos fragmentos de ácido nucleico forem amplificados a partir do "*template*" inicial, mais ciclos são necessários para atingir o platô. Quanto mais DNA inicial, mais rápido o platô é atingido. A desvantagem dessa tecnologia é que as moléculas SYBR Green se intercalam entre qualquer molécula de DNA em formato de fita dupla. Assim, da mesma forma que essas moléculas são incorporadas pelos produtos de interesse, são também incorporadas e produzem sinal de fluorescência quando se formam dímeros de *primers* ou produtos de amplificação espúria. Em contrapartida, a metodologia prevê a análise do ponto de fusão (Melting Point Analyses) dos *amplicons*, que seria o momento em que as fitas de DNA desnaturam, pelo uso de temperatura alta, e se tornam fitas simples, consequentemente o intercalante se despren-

de e a fluorescência diminui gradativamente, em função da dissociação do DNA, até que a fluorescência não seja mais observada. Em seguida, num processo reverso, o sistema reduz a temperatura lentamente, promovendo o reanelamento das fitas simples dos *amplicons* promovendo, assim, o restabelecimento da fluorescência. Dessa forma, o sistema calcula a temperatura média de fusão dos *amplicons* e essa temperatura é usada para confirmar se um determinado *amplicon* corresponde ao produto desejado ou é espúrio. A escolha de *primers* que não tenham a tendência de formar dímeros ou estruturas secundárias complexas é fator de extrema importância no desenvolvimento de um teste de PCR de tempo real utilizando SYBR Green. Além disso, deve-se criar um sistema de referência da temperatura de fusão dos *amplicons* de cada organismo.

2. **TaqMan®:** é uma tecnologia comercializada pela *Applied Biossystem*, pela qual o DNA molde é amplificado usando os *primers*, mas que também inclui uma sonda específica chamada sonda de TaqMan, que contém um fluorocromo na extremidade 5' e um "quencher" na extremidade 3' desta mesma sonda. O "quencher" inibe a produção de fluorescência pelo fluorocromo enquanto a sonda de TaqMan estiver intacta. No processo de amplificação, a sonda de TaqMan hibridiza na sequência alvo a logo a segui os *primers* ião anelar nas suas respectivas posições na fita dupla de DNA. Na próxima etapa, a Taq polimerase inicia a extensão de um dos *primers* e encontra a sonda de TaqMan hibridizada. A Taq polimerase, com sua atividade de exonuclease, hidrolisa a sonda, clivando inicialmente a extremidade 5', que contém o fluorocromo. Assim, o fluorocromo se distancia do "quencher" e produz fluorescência. Os fragmentos de DNA são amplificados, e esses "*amplicons*" servirão de *template* para dar continuidade ao aumento exponencial dos fragmentos de DNA. O nível da fluorescência aumenta em função da quantidade de sondas hidrolisadas a cada ciclo durante a produção dos *amplicons*. Essa metodologia confere maior acurácia ao resultado, uma vez que somente será obtida fluorescência se a sonda hibridizar ao DNA alvo específico e os *primers* anelarem nas regiões complementares específicas. No entanto, o correto desenho dos *primers* e da sonda de TaqMan é fundamental para que não haja reação cruzada com outras moléculas de DNA que possam conter resíduos de nucleotídeos semelhantes. Embora a utilização dos *primers* genéricos e sondas de TaqMan específicas normalmente produzam resultados satisfatórios, o nível de especificidade torna-se extremamente alto quando *primers* e sondas específicos são utilizados. Uma grande vantagem dessa técnica é a possibilidade da PCR de tempo real multiplex, que se baseia na utilização de diferentes fluoróforos, que emitem fluorescência em comprimentos de onda distintos, acoplados a sondas diferentes, específicas para diferentes patógenos. Assim é possível realizar em apenas um exame a investigação de múltiplas infecções, basta inserir sondas específicas ao patógeno com fluorocromos com características diferentes. O resultado do exame fundamenta-se no espectro da fluorescência onde houve amplificação, a qual corresponde a sonda específica que deve hibridizar com o DNA do patógeno específico.

Existem outras metodologias que também utilizam sondas específicas para a amplificação do DNA alvo, porém a tecnologia de liberação do fluoróforo é diferente, como os sistemas *Beacons* e *Scorpions,* no entanto estes não são muito utilizados.

LAMP – *LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION*

A amplificação isotérmica mediada por um laço, do inglês *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) é uma técnica altamente específica e sensível, capaz de discriminar apenas um nucleotídeo. É caracterizada pelo uso de seis *primers* diferentes especificamente desenhados para reconhecer oito regiões distintas de um gene alvo. Diferente da PCR, essa técnica utiliza uma enzima DNA polimerase que atua em temperatura entre 60 °C e 65 °C para a produção dos produtos de amplificação, isso traz uma grande vantagem, pois se elimina a necessidade do uso de termocicladores, especialmente em estudos de campo ou em laboratórios desprovidos deste equipamento. Além dessa vantagem, neste método é possível observar o resultado a olho nu, isso se deve ao fato de que, durante a incorporação dos nucleotídeos pela DNA polimerase, ocorre a liberação de íons pirofosfato. Isso culmina no acúmulo de precipitados esbranquiçados no tubo, o que aumenta a turbidez da amostra e, assim, esta é classificada como positiva. Essa técnica vem sendo desenvolvida para o diagnóstico de algumas infecções parasitárias, tais como malária, babesiose, Chagas, criptosporidiose, amebíase, teníase e esquistossomose.

SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (*NEXT-GENERATION SEQUENCING* – NGS)

O sequenciamento de nova geração é uma tecnologia que se baseia no sequenciamento direto do material genômico existente em uma amostra, sem que haja amplificação prévia do DNA alvo. Inicialmente conhecida como sequenciamento massivo ou sequenciamento paralelo, essa tecnologia tem se disseminado mundiamente para sequenciamento genômico, principalmente de agentes virais e bacterianos. As técnicas mais utilizadas de NGS se baseiam na fragmentação do DNA genômico com posterior ligação de fragmentos curtos de fita única de DNA, chamados de adaptadores nas extremidades. Esses adaptadores são sintetizados em laboratório e suas sequências são conhecidas. O sequenciamento paralelo se inicia através desses adaptadores e, com isso, não é necessário ter informação prévia do DNA ou material nucleico a ser sequenciado. O sequenciamento dos fragmentos de DNA ocorre de forma massiva, gerando milhões de se-

quências que serão analisadas em programas específicos de bioinformática.

Dessa maneira, é possível detectar o DNA alvo e os contaminantes em uma mesma reação de sequenciamento, de forma paralela e simultânea. Pode-se, no entanto, utilizar a PCR para obter amplificações genéricas abrangentes a vários grupos taxonômicos, como as sequências de DNA ribossomal de procariotos (16S) ou de eucariotos (18S), ou de genes mitocondriais, como o citocromo-c-oxidase, dentre outros. Esses *amplicons* podem ser sequenciados paralelamente e separados com aplicações de bioinformática. O uso dessa tecnologia possibilita uma análise global de todo e qualquer grupo taxonômico presente em uma mesma amostra. É muito utilizada em estudos de metagenômica para identificação de comunidades microbianas e faunísticas de solo, resíduos industriais e recursos hídricos.

A utilização dessa tecnologia ainda tem a sua aplicação muito limitada no diagnóstico de doenças infecciosas. Em alguns casos já utilizaram a metodologia, principalmente em pacientes cujo diagnóstico laboratorial comum não chegou a resultados conclusivos. Ainda é uma tecnologia que demanda custo elevado e profissionais capacitados, mas sem dúvida, em um futuro próximo, tornará a maioria dos testes moleculares atuais obsoletos.

PROTEÔMICA

A proteômica é uma técnica que permite o estudo global de *todas* as proteínas presentes em uma amostra. Inicialmente, a separação por eletroforese de duas dimensões (2D), que utiliza propriedades físico-químicas para separação de proteínas na primeira dimensão e separação por massas moleculares, na segunda, em gel de poliacrilamida, teve um papel importante para os estudos iniciais de proteômica, onde era possível analisar proteínas *totais* em amostras distintas. No entanto, uma limitação importante é a sensibilidade; na 2D estima-se que seja possível visualizar apenas cerca de 10% da condição geral da expressão proteica em dado momento celular.

Mais tarde, as proteínas resolvidas pelo 2D podem ser removidas do gel e levadas a equipamentos sensíveis, capazes de detectar as massas de peptídeos gerados a partir das proteínas, são os espectrômetros de massas. Avanços nesses equipamentos permitiram que as análises atingissem o nível de sensibilidade a menos de um Daltone também a injeção direta da amostra sem a necessidade de separação inicial pelo 2D. As análises por espectrometria preveem a fragmentação de proteínas em peptídeos, utilizando proteases específicas, e a posterior energização dos mesmos por ionização. Os peptídeos ionizados são lançados em um tubo de vácuo, onde se locomoverão em direção a um detector. O tempo que cada peptídeo leva para atingir o detector é chamado de "tempo de voo" e é de onde se calcula e é gerado o espectro correspondente a cada peptídeo. O espectro é expresso em massa/carga (M/Z). Após a geração dos espectros, é possível selecionar peptídeos para consequente identificação da ordem sequencial dos aminoácidos presentes no peptídeo e, posteriormente, a identificação da proteína. Para tanto, são necessários equipamentos dotados de câmaras de colisão onde é injetado um gás neutro. Os peptídeos sofrerão alta fragmentação e também terão sua massa medida, assim é possível chegar à sequência ao nível de aminoácidos.

Dois tipos de análise podem ser feitos com os resultados dos espectrômetros de massas. No primeiro, quando se tem apenas os perfis das massas dos peptídeos, são utilizados bancos de dados de "*finger printing*" ou seja, uma espécie de identidade que cada proteína terá ao ser clivada com proteases específicas. As massas de cada peptídeo gerado pela clivagem da enzima serão sempre as mesmas. As massas dos peptídeos são, então, depositadas em bancos públicos de dados, que servirão para comparação das massas de peptídeos obtidos pelo espectrômetro de massas, identificando-se a proteína por comparação das massas dos peptídeos. O grande limitante nessas análises são os bancos de dados disponíveis; se uma dada sequência não tiver sido nunca depositada em bancos de dados, será muito difícil identificá-la. Quando os peptídeos são lançados na câmara de colisão, ocorre a fragmentação dos peptídeos, e estes são novamente fragmentados, porém em peptídeos ainda menores ou até aminoácidos. Neste caso, a identificação da proteína é baseada na similaridade da sequência com dados genômicos depositados em bancos públicos também.

Os principais equipamentos atualmente utilizados são MALDI-TOF MS/MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry*), SELDI-TOF MS (*Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Time Of Flight – Mass Spectrometry*), LC-MS-MS (*Liquid chromatography – mass spectrometry*).

Algumas tentativas de utilização dessa tecnologia para aplicação clínica têm-se focado na investigação do perfil proteico de amostras provenientes de indivíduos infectados *versus* o perfil de amostras provenientes de indivíduos não infectados, chamadas assim de biomarcadores. Nas infecções parasitárias, sua utilização ainda é muito tímida, porém alguns estudos já foram realizados em cisticercose, tripanossomíase africana, fasciolose e doença de Chagas, onde foi possível traçar um perfil proteico diferente em indivíduos infectados. No entanto, não são ainda testes utilizados na rotina clínica, devido ao alto custo e ainda demandarem validação técnica. Mas são muito úteis na descoberta de novos alvos para o desenvolvimento de testes diagnósticos.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Centers for Disease Control and Prevention. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.cdc.gov/dpdx
2. da Silva AJ, Pieniazek NJ. Latest Advances and Trends in PCR-based Diagnostic Methods. In: Dionisio D. Textbook-Atlas of Intestinal Infections in AIDS. Italia: Springer-Verlag, 2003. p.397-412.
3. da Silva AJ. Advances in diagnostic parasitology-telediagnosis and molecular methods. In: Amato-Neto V, Grycheck RCB, Amato VS, et al. Parasitology: a Clinical Approach. São Paulo: Elsevier, 2008. p.404-16.

4. Ndao M. Diagnosis of Parasitic Diseases: Old and New Approaches Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases 2009. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1155/2009/278246
5. Snounou G,Viriyakosol S, Zhu XP, et al. High sensitivity detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol. 1993;61:315-20.
6. Weerakoon KG, McManus DP. Cell-Free DNA as a Diagnostic Tool for Human Parasitic Infections. Trends Parasitol. 2016. pii: S1471-4922(16)00007-6.

48

capítulo

Vera Lucia Pagliusi Castilho ▪ Elenice Messias do Nascimento Gonçalves

Controle de Qualidade em Parasitologia

INTRODUÇÃO

As parasitoses apresentam peculiaridades clínicas e epidemiológicas diversas e atingem, principalmente, indivíduos de maior vulnerabilidade social, implicando um grave problema de saúde pública por causarem morbimortalidade derivada de desequilíbrios nutricional e cognitivo.

Em áreas onde o acesso a serviços de saúde e as condições de saneamento básico ainda são deficientes, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o tratamento preventivo coletivo para helmintíases, que deve ser precedido de atividades educativas, respeitando o direito do indivíduo de participar ou não do tratamento.

Em situações diversas à citada, o diagnóstico das parasitoses deve ser processado em um laboratório de parasitologia clínica, por meio de técnicas tradicionais de concentração e coloração sob microscopia, ensaios imunológicos e moleculares, entre outras, as quais permitem a prescrição do tratamento adequado para a parasitose detectada.

O laboratório de parasitologia clínica realiza os exames que contemplam a pesquisa de enteroparasitas, hemoparasitas e ectoparasitas. A detecção microscópica e identificação morfológica de parasitas em amostras biológicas são as mais utilizadas no diagnóstico laboratorial das infecções parasitárias. As limitações dos métodos tradicionais se devem à capacitação e habilidade do microscopista, ao tempo exigido para sua realização, assim como à baixa sensibilidade, que pode ser otimizada por processamento, em série, de diferentes técnicas. Essas técnicas são extremamente dependentes de variáveis como densidade da infecção, metodologia aplicada, manutenção e calibração de equipamentos empregados, validação de reagentes, treinamento e conhecimento dos operadores. Em contrapartida, são simples, de baixo custo e elevada especificidade. Quanto aos ensaios imunológicos para detecção de antígenos, estes são rápidos e de fácil manuseio, mas a disponibilidade comercial se restringe a poucos parasitas. O diagnóstico por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos e por citometria de fluxo é ainda muito pouco utilizado para a rotina laboratorial, mas promissor, principalmente, para a detecção de infecções assintomáticas e com baixa carga parasitária.

Para alcançar o nível de qualidade desejado, no entanto, o laboratório requer identificação, coleta, preservação e transporte adequados das amostras, pois a interpretação dos resultados depende da qualidade da amostra submetida à análise e de microscopistas treinados para avaliar as diferentes formas evolutivas dos parasitos e as metodologias mais adequadas.

Os laboratórios clínicos, incluindo o de parasitologia, respondem por 60% a 70% das decisões clínicas sobre seus pacientes, razão imperativa para que produzam resultados tecnicamente válidos, ou seja, com garantia de precisão e exatidão derivada de um processo que possui qualidade conhecida, comprovada e em conformidade com os mais altos padrões. A obrigatoriedade de melhoras contínuas exercidas pelos laboratórios clínicos tende a oferecer melhor atendimento e laudos mais precisos e exatos, necessários a auxiliar a decisão médica, evitando, portanto, aumentar riscos ao paciente, assim como diminuir sua permanência em estado de consultas ou doença.

SISTEMA DA QUALIDADE EM LABORATÓRIOS CLÍNICOS

Histórico

Qualidade, conceito incorporado à produção industrial na década de 1920, era gerencial e se baseava na inspeção final do produto para que o defeituoso não chegasse ao consumidor; esse processo implicava perda total do produto, e maior custo, por consequência de uma avaliação tardia. Nas décadas de 1930 e 1940, a variabilidade na produção passou a ser considerada uma consequência natural. Com o desenvolvimento industrial, a ausência de defeitos era uma meta a ser alcançada em razão da satisfação do cliente, e para isso foi adotado o controle de processo com introdução de técnicas estatísticas. Assim, em 1951, Joseph Juran aborda os custos da qualidade em evitáveis e inevitáveis, associados à redução e à prevenção de defeitos, respectivamente.

Em 1947, nos EUA, um *pool* de soro humano foi utilizado para comparar as análises de um grupo de laboratórios. O controle interno, em 1950, é aprimorado por Levey e Jennings, com representação gráfica dos valores diários, e

nas organizações surge o conceito de garantia da qualidade, preocupando-se tanto com o produto como com os processos produtivos.

No Brasil, nas décadas de 1970 e 1980, foram introduzidos dois programas de controle da qualidade em laboratório clínico: o Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC), e o de Proficiência em Ensaios Laboratoriais (PELM) pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC).

Em meados de 1990, o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS) criou um documento normativo de sistema da qualidade para laboratórios clínicos, publicado como GP26-P (NCCLS; 1988) a partir de dez instruções (Quality System Essentials – QSEs) publicadas pela American Association of Bloods Banks (AABB), contendo muitos requerimentos desenvolvidos pelas instituições Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA 88), Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations (JCAHO) e College of American Pathologists (CAP).

Em 1998 foi criado e disponibilizado pela SBAC o Programa de Acreditação do Departamento de Inspeção e Credenciamento da Qualidade (DICQ), embasado na ISO 9000, ISO/TC 212 e NBR 14500. No mesmo ano, a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (SBPC/ML) disponibiliza o Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos (PALC), criado a partir do consenso de especialistas brasileiros, da literatura científica e de normas nacionais e internacionais, tais como Boas Práticas para Laboratórios Clínicos (BPLC), do Brasil; International Organization for Standardization (ISO), CAP e CLSI, dos Estados Unidos. Ambos os programas, em versões posteriores, incluíram aspectos da RDC 302, NR-32 e RDC 306 (Brasil).

Em abril de 1999, em Estocolmo, na Suécia, a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), a International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) e a OMS promoveram uma conferência internacional para discutir especificações da qualidade em Medicina Laboratorial, que reuniu 27 países e resultou em Consenso de hierarquização de especificações da qualidade, de acordo com o grau de atendimento aos requisitos clínicos (Figura 48.1). É recomendável que o modelo escolhido atenda à estratégia de mais elevada posição hierárquica.

Sistemas de qualidade têm sido implantados em serviços de assistência à saúde, tanto públicos como privados, incluindo laboratórios clínicos, e em atendimento às normas, diretrizes e legislações vigentes. Entende-se por sistema da qualidade a estrutura organizacional, os procedimentos, as responsabilidades, os processos e os recursos necessários para implementar a gestão da qualidade. A gestão da qualidade total acrescenta a esses conceitos uma estratégia de gestão global e de longo prazo, bem como a participação de todos os membros da organização em benefício dela própria, dos seus membros, dos clientes e da sociedade como um todo.

Essa implantação implica estabelecer objetivos da qualidade, que devem ser mensuráveis e coerentes com a política de qualidade, e enfatizados nas diferentes fases do processo,

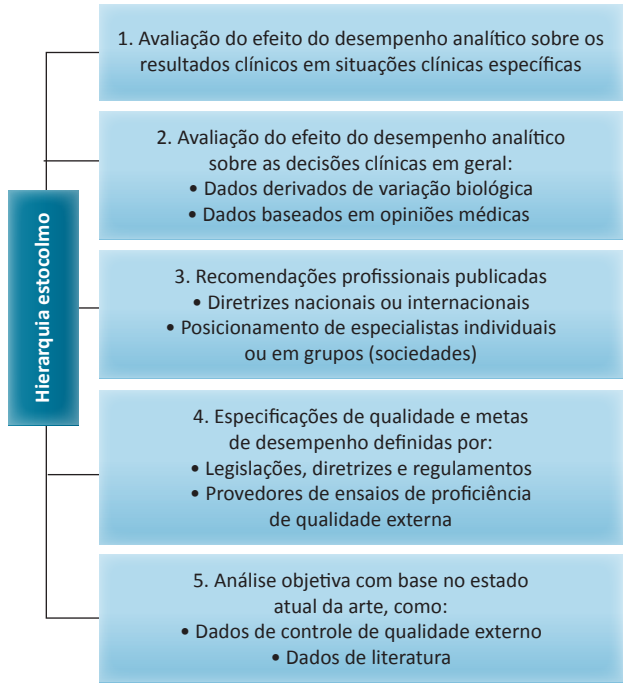


Figura 48.1 A hierarquia Estocolmo de metas de qualidade analítica.
Fonte: Adaptada de Sikaris, 2012.

em associação com a aplicação das Boas Práticas em Laboratórios Clínicos (BPLC). Esse direcionamento implica efetivação da qualidade de serviços e consequente reconhecimento e confiança dos clientes, assim como maior competitividade de mercado. Atualmente conhecimentos sobre organização e gerência são requeridos em busca de aprimoramento de um arranjo conceitual associado a um conjunto de técnicas e conhecimentos, marcados por um forte perfil disciplinar, uma vez que, para Deming (1982), Crosby (1979) e Juran (1974), a maioria dos problemas da qualidade de uma organização é causada por seus dirigentes, e não pelos colaboradores. Por ser um processo de mudança organizacional, a integridade do sistema de gestão da qualidade só é assegurada com o envolvimento de todos os colaboradores, principalmente dos líderes, ressaltando que a melhoria da qualidade é um processo contínuo que não permite atalhos.

Usos das especificações analíticas da qualidade

O laboratório de parasitologia tem como produto ou serviço final o resultado do exame solicitado a partir de um conjunto de atividades calcado em recursos e valores denominado processo, o qual pode ser dividido em três etapas ou fases: pré-analítica (obtenção da amostra biológica), analítica (processamento analítico) e pós-analítica (laudo final). Cerca de 60% dos erros identificados no laboratório ocorrem na fase pré-analítica e para melhor monitoramento são subdivididos entre os que ocorrem fora do laboratório (solicitação

de exame inadequada; identificação errada do paciente; recipiente inadequado; recipiente indevidamente identificado; coleta, acondicionamento, preservação e transporte de amostras inadequados; volume de amostra insuficiente ou extravasado, além das variáveis fisiológicas e endógenas do paciente) e os que ocorrem sob o controle do laboratório (triagem, encaminhamento, identificação e rastreabilidade da amostra). A fase pós-analítica responde por cerca de 30% dos erros e se caracterizam por comunicação deficiente, não comunicação de valores críticos, validação errada dos dados analíticos, e disponibilização tardia do resultado (mais conhecido como *turnaround time* – TAT). Menos de 15% dos erros ocorrem na fase analítica, e provavelmente estão relacionados a amostra biológica adequada, seleção e validação de metodologias, certificação e calibração de equipamentos, qualificação de fornecedores, qualidade da água (grau de pureza), temperatura ambiente, materiais de controle, manejo adequado de resíduos e, principalmente, à presença de colaborador habilitado e capacitado.

Os clientes (colaboradores, pacientes e clínicos), ao buscarem o laboratório clínico, esperam um resultado laboratorial correto, entregue no menor prazo possível e com preço adequado, ou seja, buscam eficácia (qualidade) e eficiência (prazo e custo). O atendimento à expectativa dos clientes e a liberação de resultados laboratoriais dentro de padrões pré-estabelecidos de exatidão e precisão resumem o desempenho do laboratório clínico e estão diretamente relacionados à qualidade do produto oferecido. Esse desempenho é medido por de indicadores de qualidade e permite a tomada de decisão baseada em fatos e dados, promovendo melhoras continuas que asseguram maior confiabilidade dos resultados e bem-estar dos trabalhadores, operacionalização da gestão de riscos, prevenindo acidentes e preservando o meio ambiente. O monitoramento é feito por controles de qualidade comercializados ou produzidos internamente e avaliados em determinados pontos do processo produtivo. Em atendimento à RDC nº 302/2005, a responsabilidade de planejar, implantar e garantir a qualidade dos processos é da direção e do responsável técnico do laboratório clínico. A Figura 48.2 sugere as especificações da qualidade no processo analítico, desde a seleção de um método laboratorial até o monitoramento de desempenho após sua implantação na rotina.

Controle de qualidade

O sucesso da implantação de um sistema de qualidade está diretamente relacionado ao entendimento e à avaliação dos processos exercidos, do público atendido e da análise sistemática dos indicadores para a melhora contínua de seu desempenho. Além da adoção de um modelo ou de uma proposta, há a necessidade de conhecimento e capacidade de discernimento sobre as características do laboratório, com determinação de prioridades, incorporação de atividades e estabelecimento de metas. Sua efetividade é dependente de um processo de avaliação contínuo e do seu aprimoramento.

A implantação do controle de qualidade, de forma sistemática, em laboratórios de parasitologia clínica, segundo relatos, foram iniciados no fim da década de 1970: França (1977), Estados Unidos (1979) e Inglaterra (1986). Na América Latina, destacam-se publicações que versam sobre a aplicação de controle de qualidade e detecção de falhas no diagnóstico parasitológico em: Chile e Peru (1995), Cuba (1996,1997 e 2001), Colômbia (1998) e Venezuela (2006). Esses relatos indicam, em sua maioria, a utilização de metodologia única (método direto), identificação errônea ou inexistente de parasitos, colaboradores rotativos, uso de equipamentos com manutenção precária e de insumos não rastreáveis e não utilização sistemática de controles de qualidade.

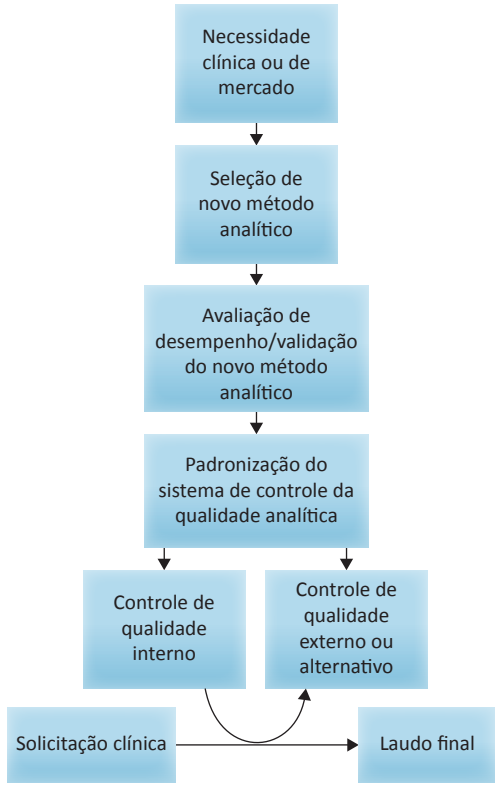


Figura 48.2 Sugestão para implantação das especificações da qualidade.
Fonte: Acervo dos autores.

Em São Paulo, Brasil, a implantação do Sistema de Gestão da Qualidade (1996) e da Certificação (1997) com base na norma NBR ISO 9002/94, na Divisão de Laboratório Central (DLC) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), exigiu, em primeiro momento, dos diferentes laboratórios constituintes, incluindo o de Parasitologia, uma análise minuciosa de todos os seus exames estabelecidos em rotina, em relação a aspectos técnicos, organizacionais e administrativos, além de ter identificado desvios e proposto oportunidades de melhora. A partir dessa análise, o Laboratório de Parasitologia instituiu um plano de ações para controle efetivo de realização da produção por meio de: a) controle de insumos; b) controle de metodologias empregadas; c) controle dos equipamentos utilizados; d) capacitação e habi-

litação dos funcionários envolvidos na análise; e e) controle das condições ambientais. Foram adotados como princípios básicos para sua implantação: a) reciprocidade – o processo deve ser de cooperação, não punitivo, mas de "mão dupla"; b) analogia – só é útil se for análogo com nossos processos; c) medição – não bastam os indicadores, é preciso conhecer os processos envolvidos; e d) validação: é preciso analisar criticamente os indicadores sob a ótica de sua aplicabilidade na realidade de nosso laboratório.

Para detecção de diferentes parasitos, o laboratório de parasitologia clínica dispõe de diferentes métodos, essencialmente manuais, que divergem em objetivos, vantagens e desvantagens. O nosso laboratório associa, em paralelo, os métodos de Faust e cols.; Hoffman, Pons e Janer (Lutz); Rugai e coloração por Tricrômio, com o objetivo de otimizar a sensibilidade do exame parasitológico. Disponibiliza imunoensaios para detecção de antígenos fecais de *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*. Técnicas moleculares atendem projetos de pesquisa. Em atendimento às necessidades clínicas, de pesquisa e de mercado e em cumprimento às diretrizes, normas e legislações relacionadas, conta com quadro de colaboradores qualificado e capacitado, além de manutenção e calibração de equipamentos, fornecedores qualificados e reagentes validados. Todas as rotinas estabelecidas são validadas e monitoradas por controles de qualidade interno (CQI) e externo (CQE), graças a um planejamento prévio e claramente descrito (Figura 48.3), que contemplam um esforço sistemático para a obtenção do maior desempenho de qualidade possível.

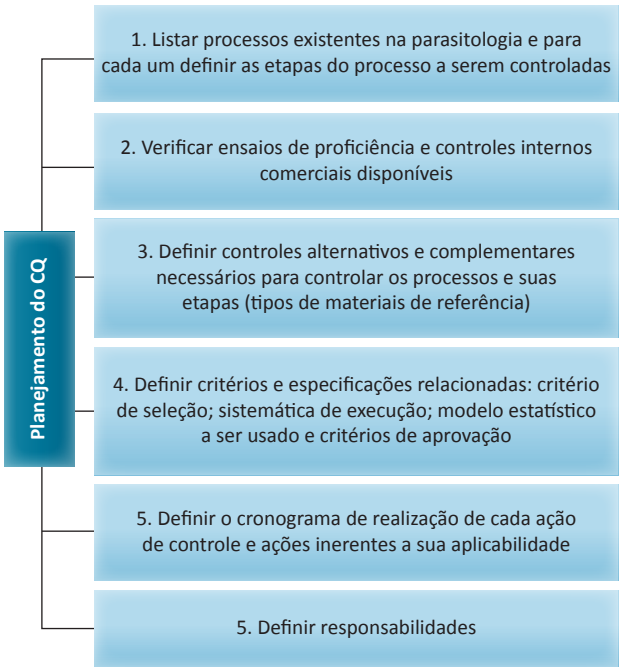


Figura 48.3 Etapas do planejamento para a implantação do controle de qualidade.
Fonte: Acervo dos autores.

O planejamento para a implantação e posterior implementação do controle de qualidade deve considerar a realidade do laboratório quanto a: custos, volume da rotina, metodologias estabelecidas, número e grau de capacitação dos colaboradores, disponibilidade de equipamentos, insumos e reagentes.

Controle de qualidade interno – CQI

Na ausência de materiais de controle comerciais, preconizados pela RDC nº 302/2005 e diferentes programas de acreditação (PALC, CAP, ONA, DICQ, INMETRO), o laboratório pode adotar materiais de referência preparados por ele para controle interno ou formas alternativas, desde que justifique sua seleção e aplicabilidade, o que implica conhecer a complexidade e o fluxograma de suas atividades. No laboratório de parasitologia, pela dificuldade de cultivo inerente à maioria dos parasitos e pela grande demanda de amostras fecais, estas são uma boa opção para o preparo de seu CQI. No entanto, alguns pontos críticos devem ser observados, tais como: critérios para a seleção do material; técnicas de preparo; verificação de sua homogeneidade, estabilidade e contaminação; determinação de valores e critérios de aprovação; armazenamento do então material de referência e seu posterior uso. Para assegurar a consistência do número de parasitos, principalmente em casos de poliparasitismo, é sugerido o processo de homogeneização da amostra clínica e adição de conservante para preservação adequada.

Materiais de referência derivados de amostras clínicas fornecem informações específicas de qualidade e de adequação, cuja avaliação está diretamente relacionada ao grau de medição, ao nível do requisito técnico necessário e à expectativa de condução nas diferentes fases do processo. Como materiais de referência adicionais, podem ser utilizados, entre outros: fotos e lâminas digitalizadas, questionários, livros de referência e atlas.

Todos os materiais de referência devem ser armazenados em condições ambientais e ocupacionais adequadas e registrados e monitorados periodicamente quanto à preservação e estoque, para que estejam em conformidade com suas aplicabilidades.

Todas as fases devem ser rastreáveis e registradas: a identificação do material de referência, a sua identificação como amostra de paciente, os resultados obtidos e os responsáveis pelo processo.

Por ser uma área essencialmente manual, o critério de aceitabilidade e adequação exige que, para métodos qualitativos, deve haver concordância morfológica na rotina diária, exceção feita aos resultados considerados sugestivos na técnica aplicada e que necessitam de confirmação por técnicas pertinentes, como, por exemplo, a desconfiança da presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em método de Lutz, e sua confirmação ou não pelo método de Kinyoun. Quaisquer outras divergências de resultados implicam inadequação, e neste caso, resultam em reavaliação do material biológico (MB) em determinado(s) ponto(s) de controle(s) da cadeia

produtiva pelos envolvidos, com discussões e adequações de resultados pertinentes. As condutas para correção de eventuais falhas devem ser padronizadas e registradas. Para métodos quantitativos, por exemplo, o cálculo de parasitemia para hemoparasitos intraeritrocitários, cabe ao laboratório determinar o valor de erro permitido.

Todas essas informações devem constituir um procedimento operacional padrão relacionado, o qual deve ter revalidação anual ou sempre que necessário. A necessidade de revalidação é decorrente de ações não planejadas e demandas por alteração do planejamento inicial, tais como: alterações graduais do processo, desgaste de equipamentos, estabelecimento de novas rotinas, adequações de insumos ou reagentes, alterações do quadro funcional ou mesmo possíveis erros humanos.

Simples cego (amostras clínicas)

O CQI simples cego se caracteriza por já ter definido o resultado esperado.

- **Aplicabilidade:** Útil para avaliar a fase analítica. Indicado para validação de reagentes e equipamentos por comparação de resultados, assim como para exames realizados com baixa demanda, baixa positividade e para os quais a manutenção de materiais positivos é dificultada. Inserido para a monitorização de todo o processo a partir de amostras preservadas. Sugerido na uniformização da abordagem microscópica diante de uma rotina diagnóstica, entre dois ou mais colaboradores, para discussão intralaboratorial na ocasião de diagnóstico, assim como para avaliar a capacidade de repetição de um analista ou para verificar a reprodutibilidade entre analistas e/ou equipamentos. Também indicado para a educação inicial e continuada de colaboradores.
- **Processo:** Os materiais de referência sugeridos são: amostras fecais preservadas, parasito isolado e lâmina preservada ou corada.
  Para a obtenção de *amostras fecais* (Figura 48.4 A), é sugerido que as já processadas e sabidamente positivas sejam selecionadas e preservadas por adição de conservantes (1:3), que variam de acordo com suas indicações e restrições. A aplicabilidade desse material de referência é indicativo do conservante mais adequado, por exemplo, para técnicas de concentração ou direto (PVA, SAF, MIF e formalina tamponada 10%), para método de Kato-Katz (azida sódica), para ensaios imunoquímicos e/ou moleculares (congelamento). Quando indicado para técnicas de concentração ou método direto, após preservação, fazer leitura microscópica de dez lâminas pelo método direto com lugol, identificar e quantificar os parasitos observados em: raros, poucos, moderados e numerosos (Tabela 48.1). Calcular a média aritmética, e classificar os parasitos em ocasionais (raros, poucos e moderados) e obrigatórios (numerosos).

Os vermes ou fragmentos enviados para identificação ou encontrados na amostra fecal devem ser lavados em água, classificados e, se íntegros, transferidos para frasco de vidros contendo líquido conservador, por exemplo, solução de Railliet & Henry para helmintos. Identificar o frasco com informações relacionadas, como identificação do parasito, conservante utilizado, data de conservação e responsável pelo processo.

Para amostras clínicas cujos exames realizados sejam de baixa demanda, baixa positividade, por exemplo, microsporídio, e para os quais a manutenção de materiais positivos é dificultada, como detecção de microfilária no sangue, é sugerida a confecção de lâminas, as quais são fixadas, identificadas e armazenadas sob condições adequadas (Figura 48.4 B). Lâminas de Kato-Katz também podem ser armazenadas.

Simples cego com outros materiais de referência (imagens físicas ou digitalizadas, referências bibliográficas – livros, atlas e artigos relacionados; lâminas digitalizadas)

- **Aplicabilidade:** Útil para avaliar a fase analítica. Indicado para validação de reagentes e equipamentos por comparação de resultados, assim como para exames realizados com baixa demanda, baixa positividade e para os quais a manutenção de materiais positivos é dificultada. Sugerido na uniformização da abordagem microscópica diante de uma rotina diagnóstica, entre dois ou mais

Tabela 48.1 Quantificação de parasitos observados na microscopia.

Classificação	Quantificação (lamínula 22 mm × 22 mm)	
	Protozoários (400×)	Helmintos (100×)
Raros	2-5 por lamínula	2-5 por lamínula
Poucos	1 por 5-10 campos microscópicos	1/5-10 campos microscópicos
Moderados	1-2 por campo microscópico à 1 por 2-4 campos microscópicos	1-2 por campo microscópico
Numerosos	Vários por campo microscópico	Vários por campo microscópico

Fonte: Adaptada de Gonçalves EMN & Castilho VLP, 2007.

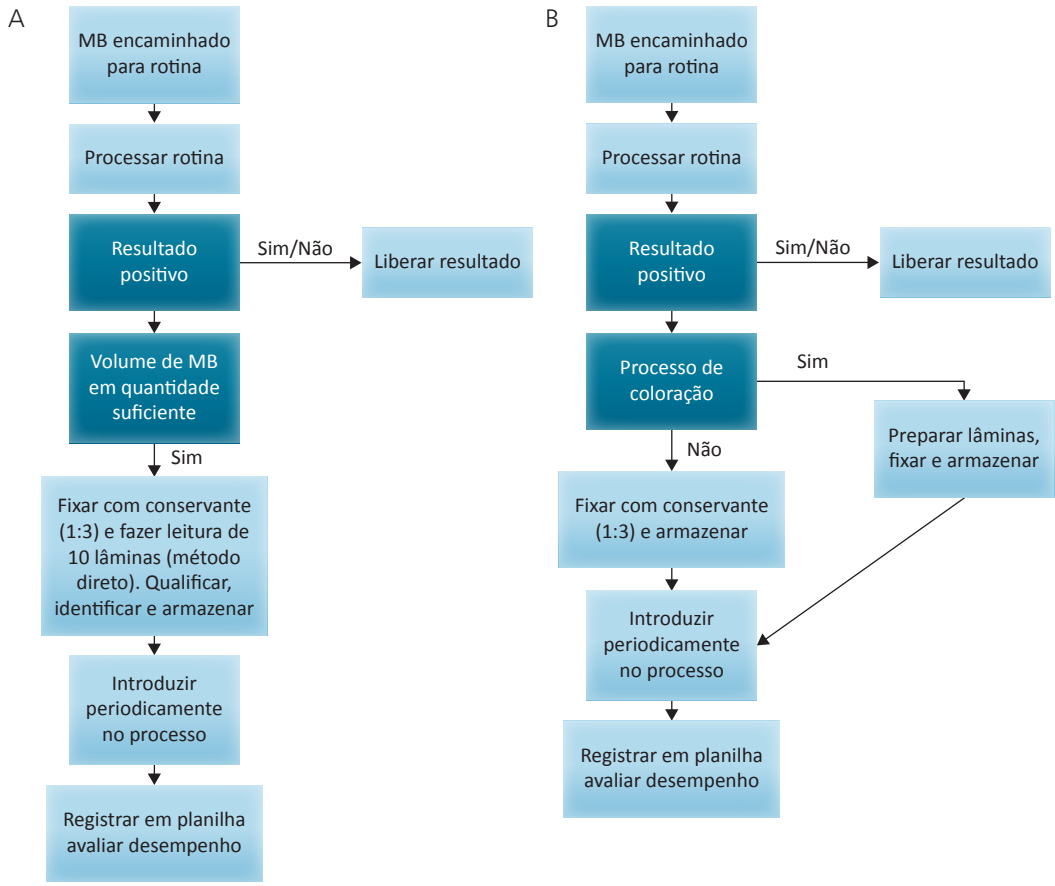


Figura 48.4 Algoritmo para controle de qualidade simples cego.
Fonte: Acervo dos autores.

colaboradores, para discussão intralaboratorial na ocasião de diagnóstico, assim como para a educação inicial e continuada de colaboradores.

- **Processo:** Os materiais de referência citados são catalogados e mantidos em locais de livre acesso para os colaboradores.

Duplo cego

- **Aplicabilidade:** Ferramenta útil para a monitorização de todo o processo, nas fases pré-analítica, analítica e pós-analítica. Pode ser utilizado tanto para avaliar a capacidade de repetição de um analista como para verificar a reprodutibilidade entre analistas e/ou equipamentos.
- **Processo:** Quinzenalmente, MB de paciente real recepcionado para a rotina diagnóstica deve ser escolhido aleatoriamente e aliquotado de imediato. O MB aliquotado é identificado com nome fictício e não faturável, cadastrado, recepcionado e reintroduzido na rotina. Todos os dados pertinentes às duas amostras (paciente e alíquota), assim como os resultados obtidos e responsáveis pelos processos, são registrados, rastreáveis e analisados (Figura 48.5). É interessante criar

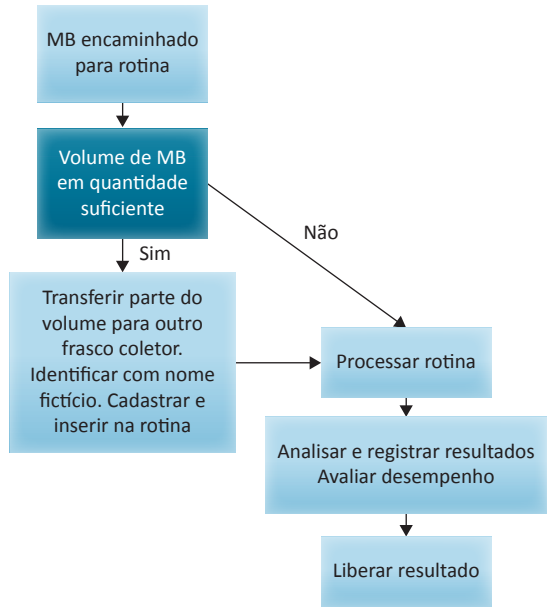


Figura 48.5 Algoritmo para controle de qualidade duplo cego.
Fonte: Acervo dos autores.

uma lista de pacientes não faturados para a utilização do controle.

Dupla leitura

- **Aplicabilidade:** De utilização diária para todos os métodos de concentrações e colorações. Boa opção para exames realizados com baixa frequência, de baixa positividade ou para os quais a manutenção de materiais positivos é dificultada, por exemplo, oograma de ovos de *Schistosoma mansoni* por biópsia retal.
- **Processo:** Todas as lâminas de rotina, derivadas de colorações ou de métodos de concentrações, são armazenadas, pelo microscopista responsável pela sua leitura, em porta lâminas ou câmaras úmidas, respectivamente. Câmara úmida consta de gaze umedecida em água e disponibilizada em placa de Petri tampada, identificada por data, metodologia e microscopista responsável pela leitura das lâminas acondicionadas, para que não sofram dissecação até o momento da segunda leitura pelo microscopista responsável pelo controle de qualidade, que deve selecionar um percentual das lâminas para análise microscópica em duplicata (conforme planejamento), tanto das coradas quanto das acondicionadas em câmara úmida. Esse percentual submetido à dupla leitura é armazenado até a análise e avaliação dos resultados, enquanto as outras são desprezadas.

Análise crítica do CQI

Controles de qualidade com valores (resultados) diferentes dos instituídos em critérios de aceitabilidade indicam não conformidade intra processo, e requerem análise de causas, aplicação de ações corretivas e verificação da eficácia, que culminam em um programa de educação contínua e promoção da satisfação do cliente (Figura 48.6). Dentre as possíveis causas de erros relacionados ao CQI, citamos: amostra insuficiente em quantidade e qualidade; identificação inadequada no frasco coletor; área de trabalho inadequada ou mal iluminada; troca das lâminas por falta de organização no trabalho; processamento de uma série muito grande de amostras; não homogeneização das fezes; esfregaços muito espessos ou muito delgados; uso de lâminas arranhadas ou recuperadas; acondicionamento inadequado do corante (reagente); não aderência ao tempo necessário para cada sequência do processo; descoloração inadequada das lâminas; não certificação ou inexistência da identificação da lâmina; não limpeza da lente de imersão após leitura de exame positivo; habilitação e capacitação insuficientes do colaborador.

Controle de qualidade externo

É uma exigência legal e normativa, além de fornecer uma avaliação externa e objetiva do desempenho de um laboratório clínico em seu sistema de garantia de qualidade, baseado na comparabilidade entre laboratórios.

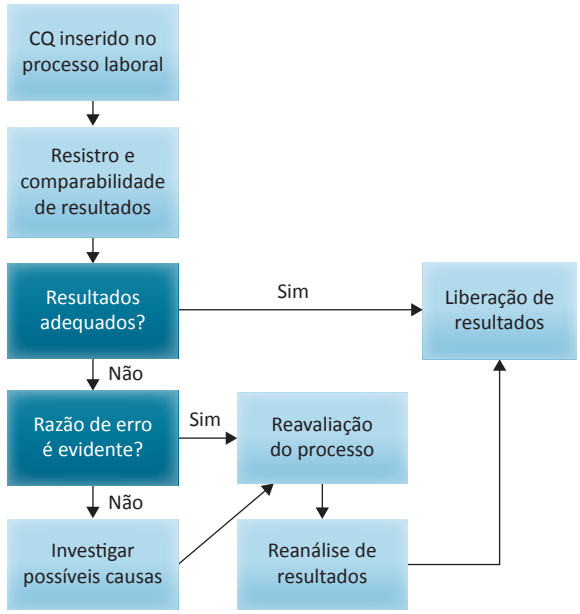


Figura 48.6 Algoritmo para análise crítica do CQI.
Fonte: Acervo dos autores.

O controle de qualidade externo, dentro do laboratório clinico no Brasil, se iniciou com as Sociedades Brasileiras de Análises Clínicas e de Patologia Clínica, conforme já citado anteriormente.

Ensaios de proficiência

A Controllab, em parceria com a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina laboratorial, com o programa Programa de Excelência do Laboratório Clínico (PELM), e a Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, com o Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ), enviam aos participantes material para o controle de qualidade externo, que inclui identificação de parasitas tanto por imagens digitalizadas como por material físico. Nesse material, o participante envia o resultado da identificação do parasita e posteriormente recebe o resultado com as avaliações. Os resultados são comparados com os pares, ou seja, com os laboratórios participantes, e a avaliação é enviada através do *site*, com resultados adequados e inadequados. A taxa anual de valores mínimos de acerto são estabelecidos pelo provedor e garantem adequação ou não do laboratório participante. Esta taxa anual advém da comparação dos resultados, enviados em todos os módulos acordados para o ano pelo provedor, através da avaliação e das análises estatísticas pelo grupo assessor. Provedores podem fornecer no final dos módulos acordados a chamada Rodada Especial, em que são inclusos os ensaios que não atingiram a meta, com intuito de aumentar a probabilidade de adequação. O objetivo do controle de qualidade externo é garantir a qualidade do laboratório participante nos ensaios inscritos. É fornecido anualmente o certificado de proficiência de qualidade nos ensaios inscritos. Todos os

ensaios oferecidos estão disponibilizados nos *sites* do PELM (http://www.controllab.com.br/) e do PNCQ (https://www.pncq.org.br/). Fora do Brasil há outros programas de controle de qualidade externo internacionais, como o CAP, que funcionam de forma semelhante, enviando as amostras para serem avaliadas pelo laboratório inscrito. Os materiais oferecidos para avaliação são lâminas coradas ou não, material liofilizado para testes de concentração e imunoensaios, além de pranchas com fotos para identificação.

Controles alternativos

Os controles alternativos são estabelecidos com outro laboratório para testes estabelecidos em rotina quando não há ensaio de proficiência específico. Para isso, o laboratório parceiro deve ter certificação de qualidade e ser participante de testes de proficiência. As amostras são enviadas na frequência estabelecida entre as partes, semestralmente ou mesmo anualmente, de acordo com os programas instituídos e o requerido. Ambos os laboratórios podem enviar e receber amostras e os resultados são analisados e corrigidos se estiverem inadequados. Esses resultados são inseridos em planilhas e todo o procedimento deverá ser estabelecido e acordado anteriormente com ambas as partes.

CONCLUSÃO

O laboratório de parasitologia continua sendo uma área de diagnóstico na qual os parasitas devem ser pesquisados e identificados, um a um, em sua imensa variedade, tornando o processo bastante trabalhoso por ser essencialmente manual. A falta de padronização de processo permite que a microscopia investigativa possa ser derivada de diferentes metodologias, associadas ou não, motivos esses que tornam a qualificação e o treinamento contínuo dos colaboradores fundamentais em todas as etapas do processo. A preocupação em otimizar essa área fez com que *kits* (sistemas fechados) de coleta fossem introduzidos no mercado, com o intuito de padronizar a quantidade de fezes enviada ao laboratório. Frequentemente, nestes *kits* as amostras fecais são enviadas em líquido conservador. Com isto o laboratório de parasitologia fica incapaz de investigar com outros métodos, na mesma amostra, outros parasitos, como para a pesquisa de larvas vivas através do termo-hidrotropismo positivo que apresentam, e necessita de amostras frescas. Outro exemplo é o método de Kato-katz, que necessita de fezes formadas *in natura* para ser realizado. Repetições necessárias, em decorrência da inconsistência de resultados, não são possíveis ao se utilizar *kits*, por ser utilizado todo o conteúdo ou por restar quantidade insuficiente. Para as técnicas moleculares, o conservante pode ser considerado interferente. É importante ressaltar que o laboratório exerce papel decisório na qualidade da amostra a ser examinada, quando na fase pré-analítica, estabelece instruções de coleta para o paciente, observando todos os interferentes na amostra fecal, intervalos de coleta, quantidade, conservação e transporte da amostra. A introdução dos controles de qualidade interno e externo no processo parasitológico abordada neste capitulo mostra que estes são complementares, uma vez que o CQI monitora a reprodutibilidade dos procedimentos no dia a dia, com detecção de erros em quaisquer das fases processuais e sinalizam a liberação ou não dos resultados, enquanto o CQE visa detectar, principalmente, diferenças constantes (*bias*) entre os resultados do nosso laboratório com outros, compreende uma verificação retrospectiva dos resultados do laboratório participante. A implantação do controle de qualidade no laboratório deve ser bem estabelecida, de forma a se adequar a sua realidade e sua utilização em todos os testes. Deve fazer parte da rotina diária e envolver todos os colaboradores, responder por treinamentos periódicos, analisar e estabelecer ações para todas as atitudes fora de controle.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Abdollahi A, Saffar H, Saffar H. Types and frequency of errors during different phases of testing at a clinical medical laboratory of a teaching hospital in Tehran, Iran. N Am J Med Sci. 2014;6(5):224-8.
2. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. ABNT NM-ISO/TS22367:2009 - Laboratório clínico - Redução do erro através da gestão de riscos e melhoria contínua (ISO/TS 22367:2008, IDT): Caracteriza a aplicação da NM-ISO 15189 como sistema para reduzir o erro de laboratório e para melhorar a segurança do paciente aplicando os princípios de gestão de riscos, no que se refere aos aspectos analíticos, especialmente os aspectos pré-analíticos e pós-analíticos do ciclo do laboratório clínico e os cuidados do paciente. Propõe uma metodologia para encontrar e caracterizar o erro do laboratório clínico que poderia ser evitado mediante a aplicação da NM-ISO 15189. p.14.
3. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. ABNT NBR 15340:2006: Laboratório clínico - Exames parasitológicos de fezes: Esta Norma descreve os critérios e os requisitos mínimos para realização de exames parasitológicos de fezes, visando a padronização do processo de pesquisa de parasitos, 2006. p.7.
4. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. ABNT NBR ISO 15189: Laboratórios clínicos - Requisitos de qualidade e competência: Esta Norma pode ser utilizada por laboratórios clínicos no desenvolvimento dos seus sistemas de gestão da qualidade e na avaliação de sua própria competência. Esta Norma também pode ser utilizada para confirmação ou reconhecimento da competência de laboratórios clínicos por manter próprios clientes, autoridades regulamentadoras e organismos de acreditação. Rio de Janeiro, 2015. p.60.
5. Baron EJ, Miller M, Weinstein MP, et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). Clin Infect Dis. 2013;57(4):e22-e12. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://cid.oxfordjournals.org/content/57/4/e22.full.pdf+html
6. Berlitz FA, Haussen ML. Indicadores de Desempenho da Fase Analítica. In: Oliveira CA, Mendes ME. Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática. 1.ed. Rio de Janeiro: ControlLab, 2010. p.119-43.
7. Blanco Y, Hernández M, Monroy F, et al. Control de calidad en el diagnóstico coproparasitológico en laboratorios clínicos

públicos de ciudad Bolívar, Venezuela. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. 2013;25(2):166-75.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. RDC nº 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos. DOU, Brasília (DF): 2005.
9. _____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. DOU, Brasília (DF): 2004.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 50, de 21de fevereiro de 2002: Dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde. DOU, Brasília (DF): 2004.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Nota Técnica Nº 039 /2014 – GRECS/GGTES/ANVISA: Assunto: esclarecimentos sobre a RDC/ANVISA nº 302, de 13 de outubro de 2005, que dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de laboratórios clínicos. DOU, Brasília (DF): 2014.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: plano de ação 2011-2015 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. p.100.
13. Castilho VLP, Gonçalves EMN. Parasitologia em Medicina Laboratorial na Prática Médica. In: Martins MA, Carrilho FJ, Alves VAF, et al. Clínica Médica. 2.ed. Barueri: Manole, 2015.
14. Chaves CD. Controle de qualidade no laboratório de análises clínicas. J Bras Patol Med Lab. 2010;46(5):352.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. Laboratory Diagnosis of Blood-borne Parasitic Diseases; Approved Guideline. CLSI Document M15-A. Wayne, 2000. p.40.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. Procedures for the recovery and identification of parasites from the intestinal tract; Approved Guidelines-Second Edition. CLSI Document M28-A2. Wayne. 2005:25(16):126.
17. Ferreira JIAX. A evolução da qualidade e sua contribuição para o ganho de vantagem competitiva das empresas [Dissertação]. Campinas: Instituto de Matemática, Estatística e Ciência da Computação da UNICAMP, 1995. p.145.
18. Freitas F. Analytical Quality Specifications in the Clinical Laboratory – Limiting Analytical Error with Allowable Error Limits. Bioanálise. 2013;X(1):22-6.
19. Gonçalves EMN, Castilho VLP. Coleta, transporte e preparo da amostra biológica - Coleta em Parasitologia. In: Andriolo A, Ballarati CAF, Galoro CAO, et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): coleta e preparo de amostra biológica. 1.ed. Barueri: Manole, 2014. p.299-304
20. Gonçalves EMN, Castilho VLP. Controle de Processo em Parasitologia. In: Oliveira CA, Mendes ME. Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática. 1.ed. Rio de Janeiro: ControlLab, 2012. p.73-96
21. Gonçalves EMN, Castilho VLP. Controle de Qualidade em Parasitologia Clínica. In: De Carli GA. Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. 2.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2007.
22. Gonçalves EMN, Castilho VLP. Parasitologia: controle de processos como aliado do diagnóstico. Uma ciência que se renova, com foco na qualidade. Boletim Qualifique. 2014;40:2- 5.
23. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Certificações – Acreditações. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.hc.fm.usp.br/index.php?option=com_content&view=article&id=398:certificacoes&catid=2:uncategorised
24. Kale S, Gumber R, Mahajan M, et al. Identifying errors involving clinical laboratory: a 1 year study. Int J Health Sci Res. 2014;4(8):48-53.
25. Ken Sikaris. Application of the Stockholm Hierarchy to Defining the Quality of Reference Intervals and Clinical Decision Limits. Clin Biochem Rev. 2012 Nov;33(4):141-8
26. Kinns H, Pitkin S, Housley D, et al. Internal quality control: best practice. J Clin Pathol. 2013;66(12):1027-32.
27. Linder E, Lundin M, Thors C, et al. Web-based virtual microscopy for parasitology: a novel tool for education and quality assurance. PLoS Negl Trop Dis. 2008:2(10):e315[8 telas]. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.plosntds.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pntd.0000315&representation=PDF
28. McHardy IH, Wu M, Shimizu-Cohen R, et al. Detection of Intestinal Protozoa in the Clinical Laboratory. J Clin Microbiol. 2014 Mar;52(3):712-20.
29. Miller WG, Jones GRD, Horowitz GL, et al. Proficiency Testing/External Quality Assessment: Current Challenges and Future Directions. Clin Chem. 2011;57(12):1670-80
30. Ndao M. Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches. Interd Perspectives Infect Dis. 2009;15. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.hindawi.com/journals/ipid/2009/278246/
31. Núñez FA, Ginorio DE, Finlay CM. Control de la calidad del diagnóstico coproparasitológico en la provincia de Ciudad de La Habana, Cuba. Cad Saude Publ. 1997;13(1):67-72
32. Oliveira SAT, Gonçalves EMN. Exames Parasitológicos de Fezes. In: Lopes JL, Gengo, Silva RC. Interpretação de Exames Laboratoriais. 1.ed. Rio de Janeiro: Àguia Dourada Ltda, 2015. p.281-96.
33. Petersen PH, Fraser CG. Strategies to set global analytical quality specifications in laboratory medicine: 10 years on from the Stockholm consensus conference. Accredit Qual Assur. 2010;15(6):323-30
34. Plebani M. The journey toward quality and patient safety in laboratory medicine continues. N Am J Med Sci. 2014;6(5):229-30.
35. Poonsamy B, Dini L, Frean J. Performance of Clinical Laboratories in South African Parasitology Proficiency Testing Surveys between 2004 and 2010. J Clin Microbiol. 2012 Oct; 50(10): 3356-8.
36. Portes HRA, Freitas LTC, Barroso MM, et al. A importância do controle de qualidade em laboratório de análises clínicas. [Monografia] Governador Valadares, MG: Universidade Vale do Rio Doce, Faculdade de Ciências da Saúde, Curso de Farmácia. 2010. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.pergamum.univale.br/pergamum/tcc/Aimportanciadocontroledequalidadeemlaboratoriodeanalisesclinicas.pdf

37. Reali JLS. Os recursos humanos e a gestão pela qualidade total. [Dissertação) Rio de Janeiro, RJ: Curso de Mestrado Executivo do Centro de Formação Acadêmica e Pesquisa da Escola Brasileira de Administração Pública e de Empresas da Fundação Getulio Vargas. [Internet] [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://bibliotecadigital.fgv.br/dspace/bitstream/handle/10438/8674/000348616.pdf?sequence=1
38. Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC). Manual para Acreditação do Sistema de Gestão da Qualidade de Laboratórios Clínicos [Internet]. Rio de Janeiro: 2013. 6.ed. [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://acreditacao.org.br/wp-content/themes/dicq/pdfs/manual_dicq.pdf
39. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial (SBPC/ML). Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos. Norma PALC versão 2013 [Internet]. Rio de Janeiro: 2013. 1.ed. [Acesso em 01 apr 2017]. Disponível em: http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/Norma_palc2013_web.pdf
40. Vieira KF, Shitara ES, Mendes ME, et al. A utilidade dos indicadores da qualidade no gerenciamento de laboratórios clínicos. J Bras Patol Med Lab. 2011;47(3):201-10.
41. Westgard JO, Westgard AS. Quality control review: implementing a scientifically based quality control system. Ann Clin Biochem. 2016;53(1):32-50.
42. Wong SSY, Fung KSC, Chau S, et al. Molecular diagnosis in clinical parasitology: When and why? Exp Biol Med. 2014;239(11):1443-60.
43. World Health Organization - WHO. Helminth control in school-age children: a guide for managers of control programmes. 2.ed. Geneva, 2011
44. Yundt-Pacheco J, Parvin CA. Validating the performance of QC procedures. Clin Lab Med. 2013;(33):75-88.

PARTE

9

Hematologia

Marcos Kneip Fleury

49

capítulo

Marcos Kneip Fleury

Hematopoese

INTRODUÇÃO

A medula óssea é o principal sítio de formação do sangue. No adulto normal sua produção diária atinge cerca de 2,5 bilhões de hemácias, 2,5 bilhões de plaquetas e cerca de 1 bilhão de granulócitos por quilo de peso. O ritmo de produção corresponde às necessidades reais de cada uma das linhagens celulares e pode variar do nível basal, suficiente para a reposição das células naturalmente perdidas, até muitas vezes o normal.

Estudos cinéticos das células medulares, usando radioisótopos e culturas *in vitro*, demonstraram que as linhagens celulares consistem de três grupos de células com características diferentes:

I. Células maduras com uma meia vida funcional finita, capazes de proliferação limitada antes da completa maturação, mas sem capacidade de autorrenovação.
II. Unidades Formadoras de Colônias (CFU) – são células capazes não só de diferenciação, mas também de autorrenovação, sendo possível a manutenção de uma produção celular sustentada. Dependem da presença de colônias de células primordiais ou primitivas.
III. Células primitivas – consistem em células pluripotenciais com capacidade de autorrenovação contínua – células-tronco hematopoiéticas (*stem cell*).

Existem unidades formadoras de colônia mais maduras que são células unipotenciais diferenciadas. Isso significa que, embora sejam capazes de formar colônias, essas células já estão comprometidas com uma linhagem celular. A atividade proliferativa dessas colônias envolve mecanismos de interação humoral entre as células da colônia e os tecidos-alvo, assim como as interações célula-célula no micro meio ambiente medular.

CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

- São definidas como células com grande capacidade de autorrenovação e grande potencial proliferativo.
- São capazes de se diferenciar em células progenitoras para as células sanguíneas (hemácias, leucócitos e plaquetas).

Autorrenovação refere-se à capacidade de produzir células-filhas com características idênticas às da célula-mãe. Esta capacidade resulta na produção de novas células sem nenhuma nova característica morfofuncional, isto é, sem qualquer diferenciação. Entretanto, a melhor definição para a "*stem cell*" refere-se à capacidade de uma única célula ser capaz de repovoar a medula óssea capacitando-a completamente a hematopoiese em longo prazo.

Nas décadas de 1930 e 1940, havia dúvidas sobre a hematopoiese no que diz respeito à sua origem. Não estava estabelecido se havia uma única célula capaz de originar todas as células sanguíneas ou se haveria mais de uma célula progenitora, uma para cada série hematológica (hemácias, plaquetas e leucócitos).

As experiências de Mc-Culloch e Till, em 1961, demonstraram que um determinado tipo de célula, presente na medula óssea, seria capaz de originar colônias de crescimento hematopoiético no baço de camundongos que tiveram sua medula óssea destruída totalmente pela radiação. Essas colônias apresentavam uma capacidade de diferenciação multilinhagem ou pluripotente (eritroide, mieloide e megacariocitária) e eram formadas por células com capacidade de autorrenovação e de estabelecer colônias de células multilinhagem quando transplantadas a outro camundongo.

Estudos citogenéticos demonstraram a origem clonal dessas colônias, ou seja, eram derivadas de uma única célula. Estas células foram designadas CFU-S (Unidade Formadora de Colônia – Baço [*spleen*]). Estes experimentos demonstraram pela primeira vez que uma célula-tronco, "*stem cell*", existia.

A existência de células capazes de formar colônias permitiu a elaboração da teoria dos compartimentos medulares. Essa teoria divide a medula óssea em compartimentos teóricos onde cada compartimento abrigaria células em um determinado estágio de maturação.

CONCEITO DE COMPARTIMENTOS MEDULARES

O entendimento do conceito de compartimentos é de fundamental importância para a compreensão dos processos de proliferação e diferenciação das células que compõem o

sistema hematopoiético. Esse conceito, absolutamente teórico, explica extremamente bem a cinética medular tanto no estado normal quanto nas alterações patológicas que envolvam as células hematológicas ou que tenham alguma repercussão nestas.

Esse conceito está baseado na divisão da medula óssea em compartimentos, cada um deles contendo um número relativamente constante de células em um determinado estágio de maturação. Os compartimentos contendo as células mais jovens seriam capazes de proliferação e diferenciação enquanto as células pertencentes aos compartimentos mais maduros somente se diferenciariam. Estes compartimentos mais imaturos seriam estáveis em relação ao seu tamanho e só permitiriam a saída de uma célula para o compartimento seguinte se outra tomasse seu lugar, recompondo, desta forma, o número de células inicial.

Sendo assim, um dos modelos aceitos para a replicação destas células seria o tipo semiconservativo ou simétrico. Após a divisão celular, uma das células permaneceria no compartimento e a outra prosseguiria no processo de amadurecimento passando ao compartimento seguinte (Figura 49.1).

A saída de uma célula de um compartimento só seria permitida se esta alcançasse o estágio de maturação necessário à sua entrada no compartimento seguinte. Dessa forma, uma sucessão de compartimentos, cada um contendo um estágio de maturação, existiria na medula e as células passariam de um para outro conforme fossem amadurecendo. O último compartimento medular conteria, então, as células maduras, prontas para serem liberadas para o sangue periférico.

Um aspecto importante desse conceito é que, sendo os compartimentos estáveis em relação ao seu tamanho, uma demanda maior de um determinado tipo celular na circulação exigiria uma maior proliferação de todos os compartimentos envolvidos com aquela série. Se a demanda de células superar a capacidade de proliferação/liberação do compartimento contendo as células mais maduras, este começa a diminuir seu tamanho e o compartimento imediatamente anterior, isto é, aquele que contém células em estágio de desenvolvimento mais precoce, começaria então a liberar suas células na tentativa de suprir a demanda existente. Este processo continua até que os compartimentos contendo as células mais jovens sejam atingidos e tenham suas células liberadas. Neste ponto, esses compartimentos se "fecham", ou seja, a liberação de células cessa e só a proliferação ocorre com o intuito de que o tamanho do compartimento seja restabelecido. Nesse momento a repercussão no sangue periférico é de uma diminuição do número de células da série envolvida.

Esta situação pode ser ilustrada de maneira clássica através da cinética medular durante uma infecção bacteriana. Quando a infecção se estabelece ocorre um aumento do número de leucócitos circulantes seguido da liberação de células mais jovens (bastões, metamielócitos etc.) caracterizando o desvio à esquerda. Se a infecção prossegue e se agrava, a leucometria aumenta progressivamente acompanhada pelo aumento do número de células jovens da linhagem granulocitária no sangue periférico. Com o agravamento da infecção é possível que se observe, em alguns casos, uma diminuição da leucometria, dando a impressão de uma melhora do quadro infeccioso. Esse fato deve-se não a uma melhora da infecção, mas sim à interrupção da liberação de leucócitos para a circulação por diminuição do tamanho dos compartimentos mais imaturos. Os compartimentos interrompem a liberação de células e se concentram apenas na proliferação objetivando a recomposição numérica.

PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO

O termo proliferação refere-se, especificamente, ao processo replicativo. A forma de proliferação das células hematopoiéticas é a mitose. A compreensão dessa forma de divisão celular é fundamental, não só para o entendimento da hematopoiese em si, como também para o entendimento da fisiopatologia das diversas doenças hematológicas (Figura 49.2).

A diferenciação é o processo pelo qual as células desenvolvem suas estruturas particulares e adquirem as macromoléculas necessárias ao desempenho de suas funções específicas. É um processo que acontece concomitantemente à proliferação e continua após o fim da capacidade de divisão. Isto é, células que já não possuem mais capacidade de divisão continuam o processo de amadurecimento.

Exemplo: O metamielócito não possui capacidade de divisão celular, porém continua o processo de amadurecimento até bastão e, posteriormente, a neutrófilo segmentado.

DIFERENCIAÇÃO

- É um processo concomitante à proliferação nas células do sistema hematopoiético.
- A célula-filha, geralmente, é mais madura que a célula que a originou quando a proliferação e a diferenciação acontecem ao mesmo tempo.
- A diferenciação prossegue após o fim da proliferação.

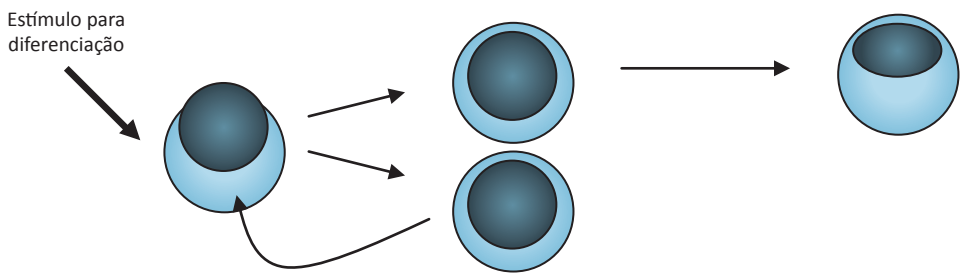
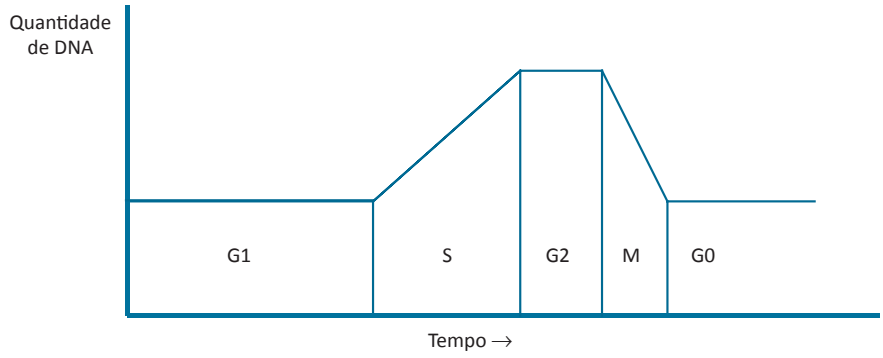


Figura 49.1 Modelo simétrico para replicação de CFU.



G0: Etapa onde não há atividade de duplicação do DNA – período de latência.
G1: DNA diploide – início da síntese do DNA.
S: Síntese efetiva de DNA.
G2: DNA tetraploide.
M: Mitose – divisão celular.

Figura 49.2 Ciclo generativo.

- A maioria das células está madura quando atingem a circulação.

HEMATOPOIESE EMBRIONÁRIA E FETAL

Os tecidos hematopoiéticos encontrados no indivíduo adulto são precedidos, durante os períodos embrionário e fetal, por focos de hematopoiese transitórios, que podem ser divididos em três fases: Períodos mesoblástico, hepatoesplênico e mieloide.

Até bem pouco tempo acreditava-se que a hemopoiese embrionária originava-se exclusivamente no mesoderma extra-embrionário, o saco vitelino. Pensava-se que as células-tronco HSC (*hematopoietic stem cell*), originadas na vesícula vitelina, colonizariam sequencialmente, o fígado, o timo e a medula óssea promovendo, desta forma, a hematopoiese definitiva no embrião, feto e no adulto. Entretanto, recentes pesquisas demonstraram a presença de focos hematopoiéticos na região do mesonéfron. Sendo assim, os primórdios da hematopoiese embrionária acontecem não só na vesícula vitelina, mas também nessa região do mesônefro (AGM – aorta-gonadal-mesônefro).

Período mesoblástico

Inicia-se na quarta semana de gestação e está localizado na lâmina mesodérmica da parede da vesícula vitelina. São observados pequenos grupos celulares, constituídos por células mesenquimais que se diferenciam em uma nova espécie celular, denominada hemangioblástica. Esses grupos celulares constituem-se nos germes do sistema circulatório e do tecido hematopoiético.

As células dispostas na periferia destes grupos celulares sofrem diferenciação e vão se tornando alongadas e achatadas formando pequenas vesículas. No interior dessas vesículas observam-se aglomerados celulares e células isoladas banhadas por certa quantidade de líquido. As células que constituem a parede da vesícula são as células endoteliais primitivas e as do interior são os precursores dos elementos celulares sanguíneos. O líquido é a matriz fluida, ou plasma incipiente e as vesículas são denominadas Ilhotas de Wolff-Pander. Por algum tempo as células endoteliais primitivas podem desprender-se das paredes onde se encontram e tornarem-se esféricas, transformando-se em precursores hematopoiéticos.

Os vasos aparecem simultaneamente, a partir das ilhotas sanguíneas de Wolff-Pander que aumentam de volume, se aproximam e confluem. Dessa forma vão se formando os vasos sanguíneos primitivos (endoteliais), encerrando o líquido e as células sanguíneas primitivas.

Período hepatoesplênico

Inicia-se no fígado do embrião, na sexta semana de gestação, e após dez semanas a hematopoiese não mais é observada na vesícula vitelina. Com o crescimento da massa hematopoiética, o baço é povoado por estas células por volta da décima segunda semana do desenvolvimento, permanecendo ativo até a 28ª semana.

Período mieloide

As cavidades dos ossos aparecem aproximadamente na oitava semana do desenvolvimento e, rapidamente, tornam-se o sítio exclusivo de proliferação de granulócitos e megacariócitos. A atividade eritropoética, nesse período, está restrita ao fígado e permanece nesse órgão até o final do último trimestre de gestação, quando então a medula óssea passa a abrigar também a eritropoese. Após o nascimento, a hematopoiese é quase exclusiva na medula óssea, sendo a contribuição do fígado e do baço muito pequena nesta fase.

Finalmente, por volta da vigésima semana, os linfonodos apresentam focos de hematopoiese.

DISTRIBUIÇÃO DA MEDULA ÓSSEA HEMATOPOIÉTICA

A medula óssea (MO) pode ser dividida em duas categorias: medula óssea vermelha, produtora de células, e medula óssea amarela, não produtora de células.

No recém-nascido e durante os primeiros anos de vida, a medula óssea produtora de células (medula óssea vermelha)

está localizada em praticamente todos os ossos do corpo. À medida que o indivíduo se desenvolve, ocorre uma concentração de medula óssea vermelha, isto é, a MO vermelha se localiza nos ossos centrais do esqueleto. No adulto os principais ossos onde a MO vermelha se localiza são os ossos do crânio, as vértebras, a epífise dos ossos longos, o esterno, as costelas e os ossos da pelve. A crista ilíaca posterior é o local de escolha para coleta de material medular para exames (Figura 49.3).

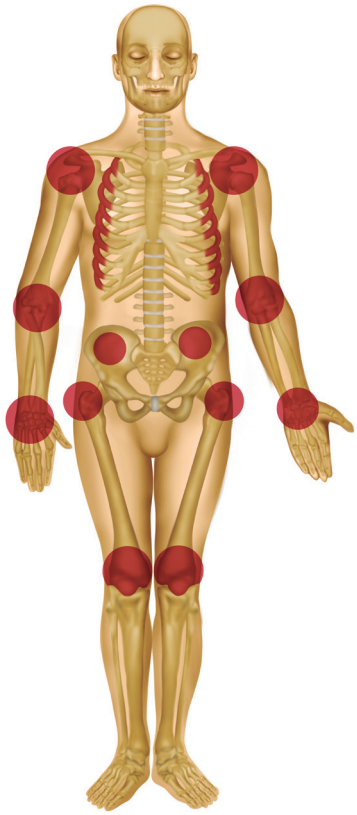


Figura 49.3 Distribuição da medula óssea vermelha (hematopoiética) em adultos. As áreas em negro mostram os sítios de hematopoiese.

Vascularização

O suprimento de sangue para a medula óssea é feito principalmente pela artéria nutriente que penetra no córtex medular através do canal nutriente. Na cavidade medular, esta se bifurca nas artérias medulares ascendente e descendente, as quais se ramificam na face interna do córtex. Após a entrada na matriz medular as artérias se transformam em uma rede de capilares que abastece as células hematopoiéticas. Estes capilares desembocam então num vaso central onde o sangue penetra no sistema venoso através das veias emissárias.

A hematopoiese acontece nos espaços extravasculares entre os capilares sinusoides da medula óssea. A parede destes capilares é constituída de uma camada interna de células endoteliais recoberta por uma camada descontínua de células reticulares. Uma lâmina basal fina e descontínua localiza-se entre essas duas camadas (Figura 49.4).

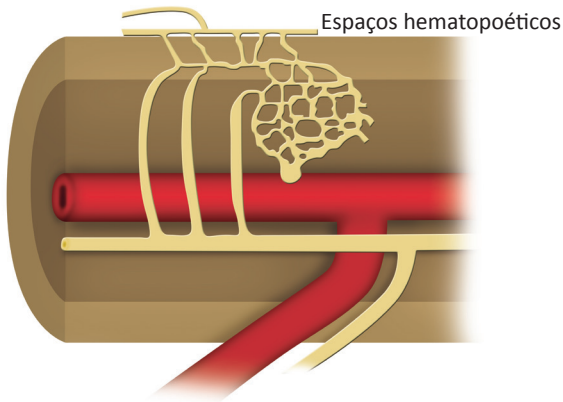


Figura 49.4 Diagrama esquemático da circulação na medula óssea.

MEIO AMBIENTE MEDULAR

Células do estroma

O meio ambiente medular consiste em um órgão complexo no qual as células do estroma são as responsáveis pela provisão da maioria dos fatores requeridos ao desenvolvimento da HSC. As células do estroma têm origem mesenquimal e hematopoiética e incluem os osteoblastos, fibroblastos, adipócitos, miócitos, células endoteliais, células dendríticas e macrófagos. Quando a medula óssea é examinada *in vivo*, as células hematopoiéticas, em diferentes estágios de maturação e pertencentes a diferentes linhagens, podem ser observadas em áreas distintas da medula. Células morfologicamente imaturas são encontradas na região subendosteal, na proximidade de osteoblastos. Outros progenitores mais diferenciados das linhagens mieloide, eritroide e megacariocitária estão localizados por toda a medula.

A arquitetura das regiões hematopoiéticas assume a forma de pequenos grupamentos celulares, contendo células progenitoras e precursores mais diferenciados. Esse arranjo sugere fortemente que o processo de diferenciação de uma determinada linhagem dependa de interações entre as células progenitoras e as células do estroma medular. Esses grupamentos consistem de células do estroma especializadas que produzem componentes extracelulares e citocinas hematopoiéticas que participam da proliferação e diferenciação celular de uma determinada linhagem.

A caracterização do papel do meio ambiente medular no processo hematopoiético tornou-se possível com o desenvolvimento de culturas de células estroma-dependentes, também conhecidas como culturas de longo-prazo LTC (*long-term cultures*). Nesse tipo de cultura, a medula óssea é cultivada em meio contendo soro humano. As células do estroma formam uma camada onde as células hematopoiéticas, HSC e HPC (*hematopoietic progenitor cell*), proliferam e se diferenciam durante semanas ou meses na ausência de fatores externos. Células mais diferenciadas, incluindo CFUs e precursores mais maduros, estão presentes em suspensão.

Fibroblastos

São as células do meio ambiente medular mais estudadas. Em geral, as células hematopoiéticas mais primitivas e algumas mais diferenciadas aderem-se a uma camada de fibroblastos. A adesão desses progenitores é feita por meio de substâncias ligantes expressas na superfície celular como VCAM (*vascular cell adesion molecule*), fatores de crescimento expressos na membrana SCF (*stem cell factor*), ou a componentes da matriz extracelular ECM (*extracellular matrix*), secretados pelos fibroblastos.

Embora o tipo e a concentração de citocinas produzidas pelos diferentes clones de fibroblastos sejam muito semelhantes, nota-se que em alguns meios ocorre o crescimento do compartimento mais primitivo, em outros, o crescimento da linhagem mieloide ou linfoide, e em alguns casos o crescimento celular mal se sustenta.

Células endoteliais

As células endoteliais da medula óssea BMEC (*bone marrow endothelial cells*) são grandes, achatadas e recobrem, completamente, a superfície interna dos capilares. Por fazerem parte do meio ambiente medular, provavelmente estas células têm influência no crescimento das *stem cells* e dos progenitores hematopoiéticos. As BMEC formam a principal barreira de controle de entrada e saída de substâncias e partículas nos espaços hematopoiéticos. As células hematopoiéticas denominadas CD34 + (*cluster of differentiation*) exibem este marcador celular em sua membrana que participa da aderência da célula à parede da célula endotelial. As BMEC apresentam atenuações no citoplasma, causadas por descontinuidade, formando uma fenestra com diafragma e permitindo, dessa forma, a passagem de células através de seu citoplasma.

Células reticulares

A superfície externa dos capilares medulares é composta de células reticulares. O citoplasma destas células "envelopam" as paredes externas dos capilares formando uma bainha adventícia. Por apresentar interrupções, esta bainha recobre cerca de dois terços da superfície dos capilares. As células reticulares sintetizam fibras que, em conjunto com os prolongamentos citoplasmáticos, penetram no compartimento hematopoiético formando uma "teia" onde repousam as células hematopoiéticas. As células, seus prolongamentos citoplasmáticos e as fibras constituem o *reticulum* da medula óssea.

As células reticulares apresentam altas concentrações de fosfatase alcalina em suas membranas, expressam CD10, CD13, antígenos HLA de classe I além de outras substâncias, mas são, geralmente, CD34 negativas. As células do estroma exibem contatos célula-célula nas "*gap junctions*" (forma de ligação entre duas células). Estas "*gap junctions*" localizam-se em áreas de aderência das células do estroma com células hematopoiéticas, protegendo-as contra efeitos citotóxicos. Essas barreiras de células reticulares estão presentes na medula óssea envolvendo os progenitores hematopoiéticos. Essas células parecem participar na liberação destes precursores para a circulação.

Células ósseas

Na medula óssea podemos encontrar osteoblastos, osteoclastos e células de gordura. As células do endósteo parecem não desempenhar papel significativo na hematopoiese. Os osteoclastos são derivados da linhagem mononuclear fagocitária e respondem a estímulos de Fator Estimulador de Colônias para Monócitos (M-CSF).

Macrófagos e linfócitos

Os macrófagos e linfócitos fazem parte do meio ambiente medular produzindo fatores de crescimento, como a interleucina-3 (IL-3), e participando dos processos de interação célula-célula com os precursores hemopoiéticos. Os macrófagos e os linfócitos são parte integrante da camada que envolve as culturas de células. Em culturas, os linfócitos T e B maduros e os plasmócitos são encontrados, frequentemente, próximos a focos de granulocitopoese.

As células do estroma produzem e respondem aos fatores de crescimento, como o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas – PDGF (*platelet-derived growth factor*). A ação do PDGF em macrófagos regula a produção de IL-1 que, por sua vez, ativa as células hematopoiéticas primitivas. Os macrófagos também participam da modulação da estrutura e da composição da matriz extracelular, além de desempenhar importante papel na eritropoese.

Matriz medular – substâncias extracelulares

As células mesenquimais que formam o estroma celular são ativas produtoras de proteínas extracelulares (ECM) como os proteoglicans, fibronectina, colágeno, laminina, hemonectina etc. A deficiência de hemonectina prejudica a aderência das *stem cells* ao estroma medular. Essas proteínas são intensamente secretadas em áreas de hematopoiese ativa. Os proteoglicans atuam como mediadores da aderência dos progenitores hematopoiéticos ao estroma. A fibronectina localiza-se nos sítios de ligação entre as células hematopoiéticas e o estroma e atuam na interação entre estas células e os focos de crescimento de monócitos/granulócitos. Os progenitores eritroides também se ligam a essa proteína. A deficiência da produção de colágeno reduz a hematopoiese *in vitro*.

■ PRODUÇÃO CELULAR

Células hematopoiéticas

Embora a visão de um corte de medula óssea possa parecer, à primeira vista, um aglomerado desordenado de células, existe uma arquitetura que determina uma localização específica para cada grupo ou conjunto de células de acordo com a linhagem ou sua função. As células hematopoiéticas repousam em cordões ou grumos localizados entre os sinusoides medulares, pois a vascularização destas regiões deve ser excelente.

Os eritroblastos estão localizados em grupamentos distintos, junto à parede dos vasos, denominados ilhas de eritroblastos. Essas ilhas são formadas de círculos concêntricos de eritroblastos envolvendo um macrófago. Os eritroblastos

das camadas mais internas são mais imaturos que os localizados mais externamente. O macrófago central emite prolongamentos citoplasmáticos que envolvem os eritroblastos e podem fagocitar uma célula defeituosa ou um núcleo que foi expulso. Em verdade podemos considerar a presença do macrófago nessas ilhas de eritroblastos realizando o controle de qualidade das células ali produzidas. O micro meio ambiente ideal para o desenvolvimento dos eritroblastos é formado por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais. Todos os elementos necessários aos processos de interação célula-célula para a produção em "*steady-state*".

Os megacariócitos também se localizam próximos à parede vascular enquanto os granulócitos maturam a uma distância maior dos vasos. Esta estrutura de distribuição de células na MO parece ser determinada por adesão específica à determinadas proteínas da matriz e ao suprimento de fatores de crescimento de uma linhagem específica. A íntima ligação dos megacariócitos ao endotélio vascular está relacionada à produção local de fatores de crescimento, como aIL-11, ligante KIT, IL-6 etc., todos relacionados ao desenvolvimento dessa linhagem.

As *stem cells* e os progenitores de granulócitos estão concentrados nas regiões mais profundas dos cordões hematopoiéticos. Os linfócitos e macrófagos concentram-se ao longo das arteríolas, próximas ao centro dos cordões.

Os macrófagos são a fonte de estimuladores e inibidores para a *stem cell*, IL-1 e Fator de Necrose Tumoral (TNF), respectivamente. Estas substâncias desempenham papel importante no controle local da hematopoiese. As células do estroma e outras células da matriz medular são fundamentais para o desenvolvimento das células hematopoiéticas.

Adesão celular e localização

A função principal da MO é a de suprir o sangue periférico com células maduras, ajustando sua produção à demanda. As células progenitoras hematopoiéticas que expressam o antígeno CD34 possuem vários receptores de adesão, o que permite sua ligação aos componentes da matriz entre os sinusoides. As interações entre receptores e ligantes facilitam a alocação dessas células na medula, permitindo, desta forma, os contatos célula-célula requeridos para a sobrevivência e proliferação das mesmas. Existem cinco famílias de receptores de adesão:

- família da integrina;
- superfamília das imunoglobulinas (ICAM e PECAM);
- família da selectina (LAM e ELAM);
- família da mucina (CD34);
- proteoglican ligado à cartilagem (CD44).

A expressão dos receptores de adesão é regulada durante a maturação das células hematopoiéticas. Consequentemente, a mobilidade celular nas áreas hematopoiéticas e a localização e o desenvolvimento das células eritroide, granulocitárias e linfoides são controlados por estes receptores, cada grupo celular respondendo às substâncias presentes em cada um dos nichos da matriz medular.

Proliferação e maturação da *stem cell*

As *stem cells* mais precoces são pluripotenciais e capazes de diferenciação tanto em *stem cell* mieloide quanto *stem cell* linfoide. Essas células podem permanecer em estado de inatividade, resistem ao ambiente de hipóxia encontrado no interior dos espaços entre os sinusoides medulares e têm sua proliferação controlada por substâncias reguladoras ligadas à matriz medular e secretadas pelos macrófagos. Esse estágio de desenvolvimento é um dos mais importantes na manutenção do número constante de *stem cells* durante a vida.

As células progenitoras mais maduras respondem às citocinas linhagem-específica e diferenciam-se em células precursoras comprometidas, ou comissionadas, com uma linhagem celular, sofrendo quatro ou cinco divisões celulares até atingir a maturidade no sangue periférico.

Os fatores de crescimento hematopoiéticos e as citocinas são produzidos por células do estroma medular e por outras células da medula. Alguns desses fatores podem ser expressos sob a forma de um ligante que, associado à membrana celular, se combina com proteínas da matriz medular, mediando, dessa forma, a ligação das células hematopoiéticas com a matriz medular. A ligação destas células à matriz medular é um processo ativo que leva à ativação localizada de cinases de adesão. Esses eventos explicam a habilidade das células do estroma em promover a autorrenovação das *stem cells*.

Células precursoras

Após a maturação das células progenitoras comissionadas, os blastos mieloides e eritroides sofrem quatro ou cinco divisões mitóticas. Os blastos megacariocitários sofrem uma única divisão mitótica e cinco ou seis divisões endomitóticas (divisão nuclear sem divisão citoplasmática). O número de células presentes na medula óssea pode ser estimado através de estudos de biópsias de medula e por medidas da absorção de ferro radioativo. A Tabela 49.1 fornece uma aproximação razoável desses números baseados nesses métodos e em estudos de cinética medular.

Liberação celular

A migração celular ocorre entre as células adventícias medulares e através das células endoteliais que desenvolvem canais de circulação durante o trânsito celular. As células em migração promovem a abertura de um poro no citoplasma das células endoteliais permitindo, desta forma, a passagem da célula madura para a circulação.

Existem alguns fatores de liberação envolvidos no processo de saída das células sanguíneas da medula. Os melhores caracterizados são aqueles responsáveis pela liberação dos granulócitos: G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos), GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos), IL-8, componente do Complemento C3, esteroides androgênicos e endotoxinas.

O citoplasma das células da bainha adventícia constitui uma barreira para a liberação dos reticulócitos. A eritropoetina reduz a cobertura celular do sinusoide medular facilitan-

Tabela 49.1 Cinética dos precursores medulares normais.

Medula			
	Nº de células/kg	**Tempo de trânsito (dias)**	**Produção (células/kg/dia)**
I – Série vermelha			
Eritroblastos	5,3 × 109	5,0	3,0 × 109
Reticulócitos	8,2 × 109	2,8	3,0 × 109
II – Megacariócitos	15,0 × 106	7,0	2,0 × 106
III – Granulócitos			
Pool mitótico	2,1 × 109	5,0	0,85 × 109
Pool pós-mitótico	5,6 × 109	6,6	0,85 × 109

do, desta forma, a saída dos reticulócitos através das células endoteliais. Para deixar a medula, os reticulócitos necessitam de um gradiente de pressão ao longo da membrana para que consigam ultrapassar o poro. As pressões no interior dos capilares são pulsáteis e a pressão necessária para proporcionar a saída dos reticulócitos é transitória.

Hemácias nucleadas raramente escapam do controle medular, sob condições normais. A ausência de eritroblastos em circulação também está relacionada à capacidade do baço em sequestrar e retirar de circulação eritroblastos que, porventura, escapem do controle medular.

A anemia ou a administração de eritropoetina aumentam, intensamente, o fluxo sanguíneo para a medula e para os ossos. O G-CSF aumenta o fluxo somente para a medula, explicando, deste modo, a liberação maciça de células granulocitárias que ocorre após a administração deste fator de crescimento.

Microfotografias de leucócitos deixando a medula óssea revelam uma intensa deformação destas células durante o processo de passagem pelo poro da célula endotelial. Entretanto, essa deformação é maior nos linfócitos e monócitos do que aquela observada nos granulócitos devido a seu núcleo segmentado. Os granulócitos imaturos devem estar "ancorados" às células reticulares através de moléculas de adesão tipo lectina. A perda gradual destas moléculas durante o processo de maturação permite a movimentação destas células em direção à parede do capilar. Mudanças nas glicoproteínas na superfície dos granulócitos medulares maduros podem também favorecer o contato com o endotélio.

Os mielócitos e metamielócitos maduros são capazes de responder a estímulos quimiotáticos e podem, através de mecanismos normais, deixar a medula.

A liberação das plaquetas é iniciada quando o citoplasma dos megacariócitos invagina-se através da bainha adventícia dos capilares até que um poro seja formado na célula endotelial. O citoplasma atravessa este poro até a luz do capilar onde, separando-se do corpo da célula, libera as plaquetas. O núcleo dos megacariócitos permanece na medula onde é posteriormente degradado e fagocitado.

A invasão da medula óssea por células neoplásicas ou tecido fibroso aumenta a frequência de células imaturas em circulação. Danos à arquitetura da medula resultando em danos à integridade da parede dos capilares também podem permitir a entrada de células imaturas em circulação indiscriminadamente.

CÉLULAS PLURIPOTENTES, PROGENITORAS E CITOCINAS

Considerações gerais

O nível de células sanguíneas circulantes é controlado por múltiplos fatores celulares e humorais e é rapidamente ajustado às necessidades do organismo. As infecções, de maneira geral, resultam numa imediata liberação de neutrófilos maduros do *pool* medular, seguidas do aumento da produção de granulócitos e monócitos até que os agentes infecciosos sejam controlados. A hemorragia e a hemólise aguda causam uma imediata liberação dos reticulócitos medulares seguida de um aumento na produção de eritrócitos sustentado até que os níveis de hemácias retornem ao normal. A produção de plaquetas responde a uma variedade de estímulos, como a diminuição do número de plaquetas, anemia aguda, inflamação etc. A produção de linfócitos T e B é modulada pela resposta a estímulos (antígenos).

Em resumo, as células maduras são derivadas das *stem cells* medulares pluripotentes, que se diferenciam em células progenitoras controladas por citocinas circulantes ou ligadas à membrana.

Stem cells e células progenitoras

A *stem cell* é definida como uma célula capaz de autorrenovação associada à capacidade de se diferenciar em progenitores para todas as linhagens hematológicas. A autor-

renovação refere-se à capacidade de produzir células-filhas com características idênticas à célula-mãe. A sequência do desenvolvimento das células progenitoras e maduras a partir da *stem cell* é mostrada na Figura 49.5.

Estudos realizados em *stem cells* humanas demonstraram que duas células-filhas oriundas de uma célula primitiva indiferenciada podem originar linhagens diferentes. Por exemplo, uma das células-filhas originando neutrófilos e monócitos e a outra dando origem a eritrócitos ou megacariócitos. Essas observações sugerem um sistema de controle de diferenciação no qual a decisão para o comissionamento de uma determinada célula ocorra durante o ciclo celular (Figura 49.6). De maneira geral, conforme características específicas se desenvolvem, o potencial proliferativo diminui.

As Unidades Formadoras de Colônias – Baço (CFU-S) são definidas como células capazes de originar colônias multilinhagem no baço de camundongos irradiados de forma letal. Após sete a nove dias da injeção de uma suspensão de células obtidas de medula óssea de um doador, observa-se o aparecimento de colônias contendo células granulocíticas, megacariocíticas e eritroides. Essas colônias contêm CFU-S, que são capazes de autorrenovação e diferenciação e podem ser encontradas em grande número na medula óssea e no baço.

As CFU-S são influenciadas pelo micro meio ambiente. Desta forma, cerca de 50% das colônias encontradas na superfície do baço são formadas por células eritroides. As colônias de granulócitos estão localizadas, preferencialmente, em regiões mais profundas deste órgão. Colônias de células também podem ser encontradas na medula óssea, sendo estas, geralmente, compostas por precursores granulocitários.

Progenitores multipotenciais primitivos

Duas classes de células primitivas, que podem ser clonadas em cultura, apresentam alta capacidade de proliferação e alguma habilidade para autorrenovação. São elas as Unidades Formadoras de Colônias – Blastos (CFU-Blasto) e a Célula Formadora de Colônias de Alto Potencial Proliferativo (HPP-CFC). Essas células primitivas, derivadas da medula, do sangue periférico ou do baço, exigem a presença de pelo menos duas citocinas para que possam formar colônias. As colônias de HPP-CFC respondem a presença de duas citocinas originando colônias de macrófagos, porém quando outras citocinas são adicionadas ao meio, colônias multilinhagem são formadas (macrófagos, granulócitos e megacariócitos).

As CFU-Blasto são colônias de células indiferenciadas que respondem a múltiplos estímulos de citocinas com a habilidade de originar precursores celulares mais maduros. Experimentos realizados em culturas de células altamente purificadas revelaram que a HPP-CFC e a CFU-Blasto necessitam de mais de sete fatores de crescimento para sua completa expressão. Alguns fatores de crescimento, quando em concentrações ótimas, podem agir em sinergismo com outros fatores presentes em concentrações mínimas.

As células progenitoras são definidas como sendo o produto da diferenciação de uma *stem cell* que restringiu seu potencial multilinhagem mantendo alguma capacidade de autorrenovação. À medida que a maturação ocorre, as células progenitoras se tornam exclusivas para uma determinada linhagem – eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos etc. (Tabela 49.2).

<table>
<tr><td colspan="8">Stem cell</td></tr>
<tr><td colspan="6">*Stem cell* mieloide
CFU-GEMM</td><td colspan="2">*Stem cell*
linfoide</td></tr>
<tr><td colspan="2">CFU-GM</td><td>CFU-Eos</td><td>CFU-
Mast/Bas</td><td>BFU-E</td><td>BFU-Meg</td><td>Progenitor T</td><td>Progenitor B</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>CFU-G</td><td>CFU-M</td><td></td><td></td><td>CFU-E</td><td>CFU-Meg</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td colspan="4"></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Neutrófilos</td><td>Monócitos</td><td>Eosinófilos</td><td>Basófilos</td><td>Eritrócitos</td><td>Plaquetas</td><td>Linfócitos T</td><td>Linfócitos B</td></tr>
</table>

CFU-GEMM = Unidade Formadora de Colônias de Granulócitos, Eritrócitos, Macrófagos e Megacariócitos.
BFU-Meg = Unidades Formadoras de Colônias de Megacariócitos.
CFU-Meg = Unidade Formadora de Colônias de Megacariócitos.
BFU-E e CFU-E = Unidades Formadoras de Colônias de Eritrócitos.
CFU-GM = Unidade Formadora de Colônias de Granulócitos e Macrófagos/Monócitos.
CFU-Eo = Unidade Formadora de Colônias de Eosinófilos.
CFU-M = Unidade Formadora de Colônias de Monócitos.
CFU-Mast/Bas = Unidade Formadora de Colônias de Mastócitos/Basófilos.

Figura 49.5 Esquema da hematopoiese.

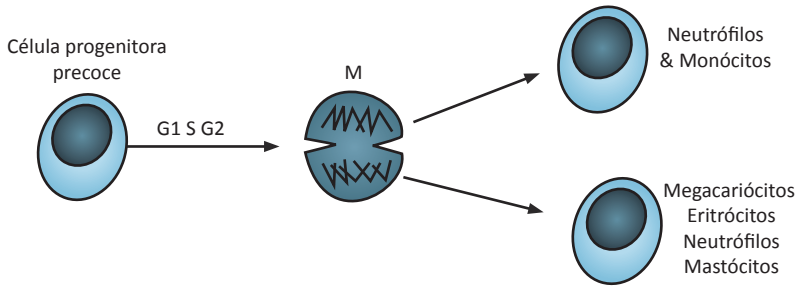


Figura 49.6 Relacionamento ciclo celular – linhagem.

Tabela 49.2 Células progenitoras, linhagens celulares e citocinas.

Progenitor	Linhagem	Citocina
CFU-GEMM	Granulócitos, megacariócitos, eritrócitos, macrófagos	IL-3, GM-CSF e Eritropoetina (EPO).
BFU-E	Eritrócitos	EPO, IL-3, IL-9, GM-CSF, IL-4.
BFU-Meg	Megacariócitos	IL-3, GM-CSF,
CFU-GM	Neutrófilos e macrófagos	GM-CSF e G-CSF
CFU-M	Macrófagos/monócitos	GM-CSF e IL-3
CFU-G	Neutrófilos	G-CSF, GM-CSF e IL-3
CFU-Eo	Eosinófilos	IL-5, GM-CSF e IL-3
CFU-E	Eritrócitos	Eritropoetina e IL-9
CFU-Meg	Megacariócitos	IL-3, GM-CSF, IL-6, IL-4 e EPO.
CFU-Mast	Basófilos e mastócitos	IL-3 e GM-CSF

Progenitores eritroides

Estudos baseados em culturas de células permitiram um detalhamento do compartimento eritroides. Estes estudos permitiram o reconhecimento de pelo menos dois progenitores eritroides, o BFU-E e o CFU-E. Sob influência da EPO, esses progenitores podem crescer em cultura e originar colônias de eritroblastos.

- **BFU-E:** está próxima a *stem cell* no desenvolvimento da série e apresenta baixa taxa de replicação do DNA. Sob a influência de altas concentrações de EPO e outros fatores de crescimento como IL-3 e GM-CSF, podem originar colônias de 500 a 5.000 eritroblastos em 14 a 16 dias. A BFU-E é considerada a precursora da CFU-E. Na verdade, após 6 a 7 dias em cultura, as células originadas das BFU-E apresentam todas as características funcionais das CFU-E. Foi estabelecido através de experimentos *in vivo* e *in vitro* que os estágios mais precoces do desenvolvimento da BFU-E não são sensíveis à EPO. Essas células podem sobreviver, em cultura, de 48 a 72 horas em ausência de EPO, mas são absolutamente dependentes de IL-3. O tamanho do compartimento de BFU-E não é afetado por variações na concentração de EPO na circulação.
- **CFU-E:** estas células estão muito próximas aos eritroblastos. Sob influência de baixas concentrações de EPO, a CFU-E pode originar, em 5 a 8 dias, colônias de eritroblastos com 8 a 50 células. O tamanho do compartimento de CFU-E é dependente da concentração de EPO na circulação. Foi estabelecido que a CFU-E é a célula com maior densidade de receptores para EPO. Sendo assim, é absolutamente dependente de EPO para sobreviver.

Proliferação e maturação do Éritron

A proliferação e a maturação ocorrem simultaneamente durante o desenvolvimento do Éritron. Todos os progenitores eritroides identificáveis estão destinados a amadurecer. Sendo assim, não têm a capacidade de autorrenovação. A manuten-

ção do tamanho do compartimento relativo ao Éritron e sua expansão são funções do compartimento de *stem cells*. São necessários de 12 a 15 dias para que uma célula no estágio de BFU-E se diferencie em eritroblasto. Em 6 a 8 dias a BFU-E prolifera e se diferencia em CFU-E, que necessita de 5 a 7 dias para proliferar e se diferenciar em eritroblasto basófilo. Durante esse período uma CFU-E sofre de 3 a 5 divisões celulares sucessivas. Provavelmente ocorrem de 3 a 5 divisões durante a maturação dos precursores eritroides. Dessa forma, cada pró-eritroblasto pode originar de 8 a 32 hemácias. A capacidade de divisão celular está presente até o estágio de eritroblasto policromático. Os eritroblastos ortocromáticos não são capazes de síntese de DNA, sendo, portanto, incapazes de divisão celular (Figura 49.7).

Os eventos bioquímicos que ocorrem durante a diferenciação de *stem cell* até o comprometimento com a linhagem eritroide são desconhecidos. O mesmo acontece com o precursor eritroide mais precoce, o BFU-E. Esta célula é completamente dependente de IL-3 e apresenta um pequeno número de receptores para EPO. Após 72 horas em cultura, essas células tornam-se inteiramente dependentes de EPO (BFU-E madura) e em presença dessa substância diferenciam-se em CFU-E.

Nessa etapa de diferenciação vários eventos podem ser identificados. A partir de estudos *in vitro*, foi demonstrado que a EPO leva a um aumento na síntese de RNA, seguido pela indução da transcrição do gene da globina β. Outros eventos bioquímicos associados com a maturação terminal da linhagem eritroide incluem o aumento da entrada na célula de glicose e cálcio, a síntese de receptores de transferrina, o aumento de captação de ferro e da síntese de hemoglobina. A síntese de hemoglobina permanece ativa durante o estágio de eritroblasto basófilo e, no estágio de eritroblasto policromático, já existe hemoglobina em quantidade suficiente no citoplasma para que a célula exiba características acidófilas. A síntese da hemoglobina persiste durante o estágio de eritroblasto ortocromático estendendo-se, embora em menor intensidade, até a etapa de reticulócito. As células maduras não são capazes dessa síntese.

Plaquetas

As plaquetas são pequenos fragmentos do citoplasma de megacariócitos maduros. Os megacariócitos, além de serem as maiores células da medula óssea, apresentam vários aspectos que os destacam:

I. são células poliploides, isto é, múltiplas duplicações cromossomiais acontecem sem que haja divisão celular;
II. originam as plaquetas através da fragmentação de seu citoplasma e não por meio de divisão e amadurecimento celular como acontece com as outras séries hematológicas. Sendo assim, as plaquetas são fragmentos citoplasmáticos, não apresentam núcleo e possuem pouquíssima atividade biossintética.

Possuem uma rede de microtúbulos que respondem pela manutenção da estrutura plaquetária, tendo atuação fundamental nos processos de mudança da forma da plaqueta durante sua ativação. A área mais central do citoplasma é dominada por grânulos de três tipos: grânulos a, d e lisossomais, que contêm uma série de substâncias envolvidas nos processos fisiológicos das plaquetas. A atuação das plaquetas no processo hemostático é inteiramente dependente de substâncias sintetizadas ainda na "célula-mãe", o megacariócito.

Embora quase não exista síntese de substâncias na plaqueta, há uma grande atividade metabólica, principalmente glicólise e fosforilação oxidativa, que suportam energeticamente atividades como a endocitose e a secreção. O sistema canalicular e o sistema tubular denso estão envolvidos intimamente com a grande superfície de contato da plaqueta e os processos de contração e secreção, respectivamente. Sob circunstâncias normais, as plaquetas sobrevivem por 7 a 10 dias em circulação. As plaquetas circulam como fragmentos isolados, não interagindo com outras plaquetas ou com qualquer outro tipo de célula no estado não ativado ou estado não interativo.

Progenitores granulocitários

Os neutrófilos, eosinófilos e basófilos apresentam padrões similares de proliferação, diferenciação, maturação, armazenamento na medula óssea e liberação para o sangue periférico. Os detalhes desses processos foram melhor estudados para os neutrófilos. Os três primeiros estágios morfologicamente identificáveis da linhagem granulocitária, mieloblasto, promielócito e mielócito, são capazes de divisão celular. Nos estágios posteriores, as células não possuem mais a capacidade de divisão, porém continuam capazes de diferenciação.

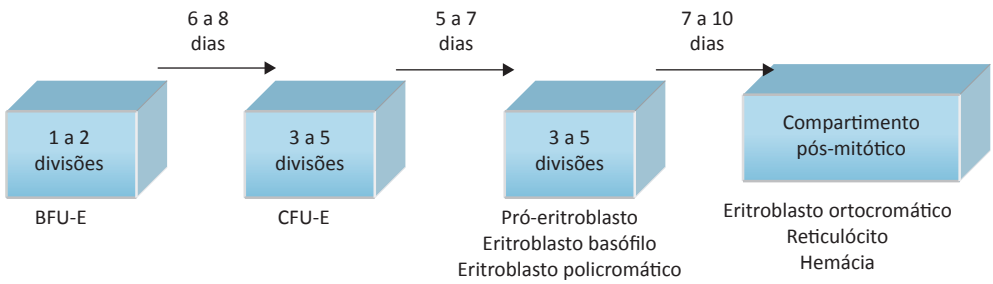


Figura 49.7 Cinética do desenvolvimento eritroide.

As "fronteiras morfológicas" existentes entre cada um dos compartimentos celulares foram definidas baseadas em critérios morfológicos como tamanho celular, relação núcleo-citoplasma, aspecto da cromatina, forma do núcleo, presença ou ausência de nucléolos e a presença e o tipo de granulações citoplasmáticas.

A classificação de uma célula em um estágio de maturação ou outro é, frequentemente, difícil porque a célula está, na verdade, em transição entre dois estágios de maturação. Entretanto, é necessário que as células sejam classificadas em compartimentos morfológicos e que valores normais sejam atribuídos a cada um deles, pois variações numéricas destes compartimentos são indicativas de doenças.

REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE GRANULÓCITOS

Para as considerações que serão feitas nesta parte do texto, devemos admitir que o "*steady state*" existe apenas durante curtos períodos. Mudanças de células entre os sítios marginal e circulante ocorrem constantemente e fazem parte da fisiologia dos neutrófilos. Estudos envolvendo leucoferese demonstraram que a reposição do número normal de leucócitos em circulação é feita por meio da mobilização dos depósitos medulares dessas células. O aumento do número de neutrófilos em circulação acontece em presença de infecções bacterianas, de endotoxinas ou quando da administração de esteroides. Essa resposta é disparada por algum sinal que, de alguma forma, estimula a produção celular levando à reposição dos estoques medulares.

As *stem cells* pluripotentes que geralmente encontram-se no estado *G 0*, devem ser induzidas à diferenciação em *stem cells* comprometidas com a linhagem e então proliferar ativamente. O estímulo ao crescimento e diferenciação da linhagem mieloide é influenciado pelo micro meio ambiente medular. Este fato originou o conceito de controle local da indução das *stem cells* até células comissionadas.

Baseado em estudos de cultura de células, três tipos celulares são responsáveis pelo micro meio ambiente necessário à proliferação das *stem cells*: células de gordura, células endoteliais e macrófagos. Presume-se que estas células do estroma medular produzam concentrações suficientes de fator de crescimento de células hematopoiéticas (HCGF) necessárias à proliferação e à autorrenovação das *stem cells*. O HCGF foi demonstrado como sendo idêntico à IL-3. Dessa forma, a IL-3 é considerada o principal mediador da autorrenovação e proliferação das *stem cells*.

O fator estimulador de colônias (CSF) é um termo usado para caracterizar uma família de glicoproteínas necessárias ao crescimento de colônias hematopoiéticas *in vitro*. Os CSF são produzidos por monócitos-macrófagos, além de outros tecidos como os leucócitos circulantes, medula óssea, placenta etc. Atualmente quatro substâncias foram identificadas como sendo capazes de estimular o crescimento de colônias.

I. Multi-CSF ou IL-3 é produzido por linfócitos T ativados por antígeno, tem a capacidade de estimular a autorrenovação da CFU-S e sua diferenciação em CFU-GM, BFU-E, CFU-E, CFU-Eos, CFU-Baso e CFU-Meg.

II. GM-CSF é capaz de estimular o crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos. Em altas concentrações, pode também estimular a formação de colônias de eosinófilos, megacariócitos e eritrócitos.

III. G- CSF é o responsável pela formação de colônias de granulócitos contendo células maduras estimulando, preferencialmente, promielócitos e mielócitos.

IV. M-CSF que estimula predominantemente colônias de macrófagos podendo, em alguns casos, agir também sobre colônias de granulócitos.

Receptores distintos para cada um dos CSFs foram identificados, e sua distribuição está restrita aos progenitores e células em amadurecimento da linhagem celular alvo. O número de receptores por célula é pequeno, porém a afinidade entre receptor e ligante é alta, o que leva à produção de efeito biológico mesmo diante de uma baixa ocupação dos receptores. Os CSFs são também necessários à sobrevivência dos progenitores e células maduras *in vitro*, e podem comissionar células progenitoras bipotenciais (CFU-GM), além de estimular várias funções celulares.

Progenitores linfoides

Os linfócitos constituem-se em uma população de células heterogêneas que diferem enormemente uma das outras em termos de origem, vida útil, localização nos órgãos linfoides, estrutura da superfície da membrana e função. Embora algumas características morfológicas como o tamanho, a presença de granulações ou a relação núcleo-citoplasma possam distinguir populações de linfócitos, não fornecem qualquer indicativo de sua linhagem ou origem. O método mais importante e preciso, atualmente utilizado em laboratório, para a identificação dessas células está baseado na caracterização de certas glicoproteínas localizadas na membrana dos linfócitos que são genericamente denominadas marcadores. Essa forma de identificação celular obteve grande avanço com o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais e a tecnologia da citometria de fluxo (Tabela 49.3).

Linfócitos B

Os linfócitos B são gerados ao longo da vida, proporcionando um contínuo suprimento de novas células B, aptas a produzirem anticorpos contra uma ampla gama de possíveis agentes patogênicos que devem ser reconhecidos e repelidos. Cada célula B carrega um único receptor gerado por meio de rearranjos dos genes das imunoglobulinas. Os fenômenos de rearranjo que levam à produção das duas cadeias da molécula de imunoglobulina ocorrem durante o desenvolvimento das células B na medula óssea, e são regulados de modo que cada célula B madura produza apenas uma única cadeia pesada e uma cadeia leve, sendo portadoras, assim, de uma única especificidade (Figura 49.8).

Tabela 49.3 Principais marcadores da linhagem linfoide.

Progenitor B precoce	Pré-B precoce	Pré-B	Célula B imatura	Célula B madura
Marcadores de superfície celular				
CD45R MHC classe II CD10 CD19 CD38	CD45R MHC classe II CD19 CD38 CD40	CD45R MHC classe II m CD19 CD20 CD38 CD40	CD45R MHC classe II IgM CD19 CD20 CD21 CD40	CD45R MHC classe II IgM, IgD CD19 CD20 CD21 CD40

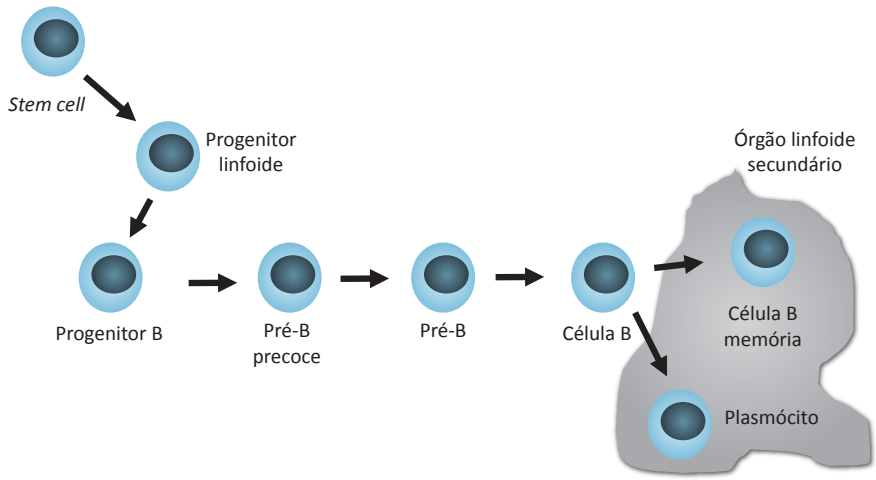


Figura 49.8 Desenvolvimento da linhagem linfoide "B".

A expressão dos receptores de antígeno na superfície do linfócito B marca uma importante linha divisória em seu ciclo de vida. A ligação de antígeno às imunoglobulinas de superfície, quando ocorre precocemente no desenvolvimento, conduz à inativação ou à morte da célula B, garantindo, dessa forma, a tolerância aos antígenos próprios.

A via de diferenciação que conduz uma célula-tronco hematopoiética até um linfócito B maduro pode ser dividida em cinco etapas: progenitor B precoce, célula pré-B precoce, célula pré-B, célula B imatura e célula B madura.

Células B virgens e já amadurecidas, que coexpressam IgM e IgD, deixam a medula óssea para circularem pelos órgãos linfoides secundários, incluindo os linfonodos, o baço e as placas de Peyer no intestino, até encontrarem o antígeno. Após interagirem com o antígeno e com células T auxiliares específicas, a progênie de células B se acumula nos folículos linfoides e forma centros germinativos, nos quais sofrem proliferação e modificações nos genes da região variável das imunoglobulinas.

As células B se diferenciam, então, em células plasmáticas, que secretam grandes quantidades de anticorpos, ou em células de memória, de vida longa, que contribuem para uma imunidade protetora persistente. Muitas células plasmáticas migram para a medula óssea, enquanto outras permanecem nos órgãos linfoides.

Linfócitos T

As células T se desenvolvem a partir de células-tronco da medula óssea e seus progenitores e migram para o timo, onde amadurecem. No timo, as células T imaturas, ou timócitos, proliferam e se diferenciam, passando por diversos estágios

que podem ser identificados por meio de seus marcadores de superfície CD44 e CD25, do complexo CD3 (receptor de célula T e CD4 ou CD8). O desenvolvimento das células T é acompanhado por extensiva morte celular, refletindo a intensa seleção das células T, com eliminação daquelas portadoras de receptores com especificidade inadequada (Figura 49.9).

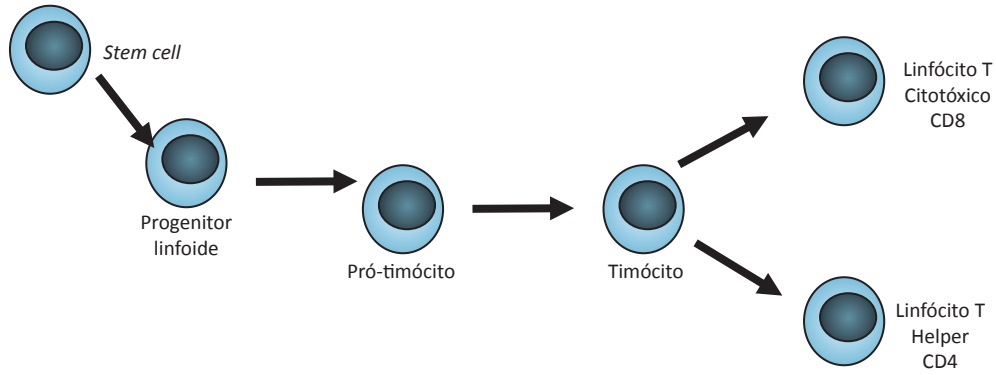


Figura 49.9 Desenvolvimento da linhagem linfoide "T".

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Células Sanguíneas – Um Guia Prático – Barbara J. Bain - Ed. Artmed 5ª Ed 2016
2. Fundamentos de Hematologia - Hoffbrand & Petit – Ed Artmed 7ª Ed 2018
3. Hematologia Prática – Dacie e Lewis – Ed. Artmed 11 th Ed 2012
4. Williams Hematology. Ernest Beutler...[et al.]. Editora McGraw-Hill. 9 th Ed 2016

50

capítulo

Paulo Cesar Naoum

Anemias – Classificação e Diagnóstico Diferencial

INTRODUÇÃO

As anemias obedecem a um padrão de análises que necessita de uma visão introdutória da hematopoiese e de valores referenciais devido à intrínseca relação de causas e efeitos dos seus diferentes tipos.

Hematopoiese e valores referenciais em hematologia são abordagens distintas, porém extremamente ligadas no sentido do entendimento do resultado de um hemograma. Nesse contexto a avaliação se faz, sob o ponto de vista dos resultados numéricos, nas formas independentes das três séries celulares do sangue, quais sejam, a série vermelha – em que são considerados os eritrócitos e seu principal componente, a hemoglobina; a série branca – em que se avaliam os diferentes tipos de leucócitos; e a série trombocítica ou plaquetária – em que se determinam as plaquetas. A avaliação do plasma e de alguns de seus inúmeros componentes também se reveste de grande importância, uma vez que, diante de um quadro patológico, o médico e o profissional de laboratório precisam analisar o conjunto de informações para interpretar o resultado de um determinado exame, conforme Tabela 50.1.

Tabela 50.1 Paciente masculino adulto com hemorragia crônica e inflamação de garganta.

Resultado laboratorial		Resultado que interessa ao médico	
CE:	3.930.000/mm³		
Ht:	29%		
Hb:	8,6 g/dL	Hb:	8,6 g/dL
VCM:	73,7 fL		
HCM:	21,8 pg	HCM:	21,8 pg
CHCM:	29,6 g/dL		
RDW:	15%		
Morfologia:	Microcitose e hipocromia	Morfologia:	microcitose e hipocromia
Ferro sérico:	38 µg/dL	Ferro sérico:	38 µg/dL
CTLFe:*	320 µg/dL		
IST:**	11,8%	IST:	11,8%
Ferritina:	360 µg/dL	Ferritina:	360 µg/dL
Leucócitos:	14.700/mm³	Leucócitos:	14.700/mm³
Plaquetas:	195.000/mm³	Plaquetas:	195.000/mm³

* CTLFe: Capacidade total de ligação de ferro.
** IST: Índice de Saturação de Transferrina
Observação: o exemplo é meramente ilustrativo, inclusive em relação à opção de interesse do médico.

A pergunta que se faz é: Por que entre as 14 avaliações laboratoriais apenas oito interessaram ao médico? A resposta é simples: objetividade analítica dos resultados. Essa objetividade inclui a história clínica do paciente e resultados que realmente podem colaborar para explicar a situação, naquele momento, do paciente. A Hb: 8,6 g/dL indica anemia moderada, o HCM: 21,8 pg (diminuído) indica que se trata por deficiência de hemoglobina, que é confirmada pela hipocromia da morfologia. Diante do fato de que a maior causa de anemia no Brasil é por deficiência de ferro (no presente caso devido à perda crônica de sangue), a avaliação de ferro e índice de saturação da transferrina são fundamentais. O ferro sérico de 38 μg/dL está diminuído e o IST de 11,8% é patognomônico de anemia por deficiência de ferro. A ferritina de 360 μg/dL está elevada, e por ser um sensível marcador de fase aguda de infecção/inflamação, confirma a inflamação de garganta do paciente. A discreta leucocitose justifica a inflamação e o número normal de plaquetas mostra que, apesar do processo hemorrágico, sua atuação não está comprometida.

Para se chegar a essa forma de raciocínio é preciso conhecer muito bem a hematopoiese, e notadamente a eritropoese, para relacioná-la com os resultados de um eritrograma.

ERITROPOESE

Essa terminologia se refere exclusivamente à formação dos eritrócitos, desde a célula-tronco pluripotencial primitiva, das células nucleadas intermediárias (eritroblastos), reticulócitos, eritrócitos, fatores da eritropoese (eritropoetina ou EPO, vitamina B_{12}, ácido fólico e ferro), fatores genéticos, fatores ambientais (infecção, queimadura etc.). Portanto, a eritropoese não se refere apenas ao desenvolvimento morfológico e funcional dos eritrócitos e de seus precursores, mas também é dependente de situações inesperadas, por exemplo, incompatibilidade materno-fetal de Rh, entre outras.

Para entender o conjunto da eritropoese, a Figura 50.1 resume os principais eventos do seu sucesso e insucesso.

O período total da eritropoese, do momento em que a célula-tronco pluripotencial é estimulada pela interleucina-3 (IL-3) a se dividir, até a formação do eritrócito, dura aproximadamente de oito dias. Somente o reticulócito consome cerca de três dias nesse processo. O eritrócito, ao sair da medula óssea, adquire a forma bicôncava nos primeiro momentos de exposição na circulação sanguínea, processo que é promovido por fatores físico-químicos que regulam a permeabilidade celular com destaques para as bombas de sódio, potássio, cálcio e ATPase. O eritrócito normal terá bom desempenho por 100 dias, aproximadamente. Entre o 100º ao 120º dias de vida eritrocitária, as bombas de permeabilidades perdem gradualmente suas ações biológicas e a morfologia bicôncava muda para a forma esférica. Os eritrócitos esféricos e envelhecidos rolam com dificuldades na microcirculação, notadamente na do sistema reticuloendotelial, dos quais 80% a 85% serão fagocitados pelos macrófagos, enquanto 15% a 20% hemolisam espontaneamente na própria circulação. Por essas razões observam-se alguns poucos eritrócitos deformados em pessoas sem anemia, alguns com corpos de Heinz – corpúsculo

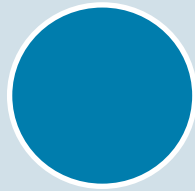
Sucesso		Insucesso
DNA Normal IL-3	 Célula tronco Pluripotencial	DNA Mutante: Hemoglobinopatias, e Deficiências de Enzimas e de proteínas de membrana
EPO	 Célula tronco Mieloide	Deficiência de EPO por ex: tumor renal. DNA Mutante: Síndrome mielodisplásica
Vit. B_{12} Ac. Fólico	 Proeritroblasto	Deficiência de vitamina B_{12} e/ou ácido fólico (várias causas)
Ferro	 Eritroblastos Basófilo, Poli e Ortocromático	Deficiência de ferro (várias causas)
Ferro	 Reticulócitos	Idem
120 dias de vida útil	 Eritrócito	Incompatibilidade Rh Infecções virais e parasitárias Queimaduras Hemorragias Transfusões incompatíveis Excesso de oxidantes Anemia hemolítica autoimune Microangiopatias, etc.

Figura 50.1 Representação da evolução do desenvolvimento das células do sangue, com destaque para a formação dos eritrócitos e suas relações com processos normais para sua evolução e processos que dificulta o amadurecimento celular.

indicativo de degradação da hemoglobina e, portanto, possibilidade de apoptose eritrocitária. No processo de fagocitose dos eritrócitos envelhecidos pelos macrófagos, estabelecem-se ações imunológicas de reconhecimento dos produtos fagocitados e que resultarão na liberação de IL-3 para estimular as células-tronco pluripotenciais a se reproduzir, bem como os átomos de ferro acumulados pelos macrófagos e obtidos das moléculas de hemoglobinas dos eritrócitos fagocitados serão passados por meio de receptores celulares específicos aos eritroblastos basófilos, policromáticos e ortocromáticos, para serem utilizados na síntese de moléculas de hemoglobinas.

Por todas essas razões é fundamental o conhecimento da eritropoese, o desenvolvimento normal das ações de sucesso na formação eritrocitária, bem como as possibilidades de causas de insucesso na eritrogênese. Ao conhecermos essas possibilidades, as análises quantitativas e qualitativas (citológicas) dos eritrócitos se tornam explicáveis quando normais ou alteradas. Para que esse processo de análise se tornasse possível de ser avaliado por diferentes profissionais, surgiram os valores referenciais para as três séries celulares.

VALORES REFERENCIAIS EM HEMATOLOGIA

Os valores referenciais em hematologia começaram a ser adotados na década de 1920 do século passado em laboratórios americanos e europeus, e na década de 1930 no Brasil. Esses valores obedecem basicamente a "distribuição normal" obtida do cálculo matemático da função de densidade de probabilidade, conhecida como distribuição de Gauss. Por meio de análises de populações sadias, estratificadas por faixas etárias e sexo, obtiveram-se valores médios das avaliações desejadas e de seus respectivos desvios padrões, estabelecendo-se o que denominamos atualmente de valores mínimo e máximo.

Todos os valores obtidos em análises hematológicas obedecem esse modelo de estrutura estatística. Inicialmente, os valores hematimétricos foram obtidos de análises químicas e físico-químicas realizadas por processos manuais. Desses processos obtiveram-se não apenas os valores referenciais, mas os conhecimentos básicos de suas reações químicas, das quantificações e das escalas de medição (mm^3, g/dL, pg, fL etc.).

Com o advento da automação e, posteriormente, da automação informatizada, obedeceram-se não somente os princípios físico-químicos das análises, mas também a adoção dos valores padrões obtidos pelos métodos manuais. Nas sequências de transferências de procedimentos manuais para os automatizados, e destes para os automatizados-informatizados, surgiram novos dados obtidos de avaliações computacionais, por exemplo, RDW (avaliação da superfície eritrocitária), MPV (volume médio plaquetário) etc.

É importante ressaltar que os valores referenciais, por mais consagrados que sejam na literatura científica, sofrem interferências enormes na sua configuração. Dentre essas interferências, destacam-se:

a) extratos socioculturais das populações analisadas;
b) condições de saneamento e estrutura social e ambiental das comunidades (cidades, bairros, hospitais) em que o laboratório atua;
c) qualidade técnica dos procedimentos analíticos, quer sejam manuais, automatizados ou automatizados-informatizados.

Por todas essas razões, o desejável seria que os valores referenciais fossem extraídos da população sadia na comunidade em que o laboratório atua. Essa é uma questão singular, porém de difícil aplicabilidade. Por isso buscam-se valores referenciais mais abrangentes.

Entretanto, mesmo na população brasileira há que se considerar as diferenças regionais, sociais e culturais, além das estruturas físicas da cidade (p. ex.: saneamento básico adequado, sistema de saúde atuante etc.) em que o laboratório está inserido, como já foi apresentado anteriormente.

Os valores referenciais que apresentamos nas Tabelas 50.2 e 50.3 a seguir foram obtidos de uma ampla população cujos

Tabela 50.2 Valores mínimos e máximos dos valores eritrocitários, conforme a faixa etária e sexo em adultos obtidos de populações de cinco cidades brasileiras#.

Eritrograma	RN*	1 a 11 meses	1 a 2 anos	3 a 10 anos	10 a 15 anos	Adulto** masc.	Adulto** fem.
Eritrócitos	5,2	4,0-4,9	4.0-5,1	4,0-5,1	4,0-5,1	4,5-6,1	4,0-5,4
Hemoglobina	17,0	10,6-13,0	11,5-14,5	11,5-14,5	11,5-14,5	12,5-16,5	11,5-15,5
Hematócrito	52,0	33-41	34-42	34-42	34-42	40-54	36-48
HCM	27-31	25-29	26-29	26-29	26-29	27-29	27-29
VCM	80-100	75-90	77-90	77-90	77-90	77-92	77-92
CHCM	30-35	30-35	30-35	30-35	30-35	30-35	30-35
RDW	10-15	10-15	10-15	10-15	10-15	10-15	10-15

* Valores médios

** O termo adulto nesse caso é considerado quando os níveis hormonais estão bem estabelecidos e a massa corporal bem definida, geralmente acima dos 15 anos.

São José do Rio Preto, SP; Cedral, SP; José Bonifácio, SP; Fronteira, MG; Frutal, MG.

Fonte: Naoum PC; 2005.

Tabela 50.3 Valores mínimos e máximos dos valores globais (contagem absoluta) e específicos (contagem percentual) de leucócitos obtidos de populações de cinco cidades brasileiras#.

Leucócitos	1 a 3 anos		4 a 14 anos		Acima de 14 anos	
	%	absoluta**	%	absoluta**	%	absoluta**
Leucócitos Totais	----	5,0-15,0	----	4,5-13,5	----	4,0-10,0
N. bastonete*	2-8	0,1-0,6	2-4	0,1-0,4	2-4	0,1-0,4
N. segmentado*	20-40	2,0-6,0	35-55	2,0-6,0	36-66	2,0-7,5
Eosinófilo	4-10	0,2-1,5	4-8	0,3-1,0	2-4	0,1-0,4
Basófilo	0-1	0,0-0,1	0-1	0,0-0,1	0-1	0,0-0,1
Linfócito	40-60	2,0-8,0	30-55	1,5-6,5	25-45	1,5-4,0
Monócito	4-10	0,2-1,5	4-10	0,2-1,0	2-10	0,2-0,8

* N: Neutrófilo
** × 10^9/L ou × 1.000/mm^3
# São José do Rio Preto, SP; Cedral, SP; José Bonifácio, SP; Fronteira, MG; Frutal, MG.
Fonte: Naoum PC; 2005.

participantes eram provenientes de cinco cidades do interior dos estados de São Paulo e de Minas Gerais. É possível que esse contingente represente com mais especificidade a população brasileira.

ANEMIAS – CONCEITOS BÁSICOS

Anemia é uma palavra latinizada (*anaemia*) proveniente do significado grego de *aima* (sangue) e o prefixo *an* (falta de), resultando a palavra *anaima* (pessoa com falta de sangue).

Atualmente considera-se anemia a constatação clínica e laboratorial de uma pessoa com valor de hemoglobina abaixo do esperado para sua faixa etária, conforme mostra a Tabela 50.4, a seguir:

Tabela 50.4 Valores normais para hemoglobinas em diferentes fases do desenvolvimento etário.

Faixas etárias	Hb (g/dL)*
Sangue de cordão (RN)	13,0-20,0
Primeiro dia de vida	15,0-23,0
Crianças de 1 mês a 6 anos	10,5-14,5
De 6 anos a 14 anos	11,5-14,5
Homem acima de 14 anos	12,5-16,5
Mulheres acima de 14 anos	11,5-15,5

* Os valores variam discretamente entre diferentes laboratórios.
Fonte: Hoffbrand AV e colaboradores; 2008.

As causas que induzem o estado de anemia em uma pessoa são muito diversas; entretanto, as principais delas se observam como consequências de vários tipos de doenças (p. ex.: hemorragias, câncer, aplasia de medula etc.), bem como alterações decorrentes de insucessos biológicos da própria eritropoese. Por essas razões, a definição de anemia é a redução de concentração do teor de hemoglobina.

O estado de anemia, notadamente a anemia crônica, tem consequências ao portador e podem ser resumidas em dois mecanismos que alteram processos fisiológicos resultantes de sua ação normal, a saber:

a) O transporte deficitário de oxigênio pela redução da hemoglobina diminui as atividades metabólicas de todas as células e induz a disfunções orgânicas generalizadas, cujos principais sintomas caracterizam-se por cansaço, fraqueza e mal-estar geral.
b) Particularmente nos processos crônicos de anemia, o organismo procura se adaptar à situação patológica com evidentes desgastes fisiológicos, especialmente para o sistema cardiorrespiratório.

Deve-se ressaltar que, ao considerarmos o estado anêmico de uma pessoa, é necessário, além da avaliação da concentração do teor da hemoglobina, a avaliação completa do hemograma, observando com detalhe os resultados do eritrograma e, com especificidade, os valores dos índices hematimétricos de VCM (volume corpuscular médio) e HCM (hemoglobina corpuscular média). Justamente esses dois índices determinam a classificação laboratorial das anemias em microcíticas/hipocrômicas, normocíticas/normocrômicas, e macrocíticas.

Além dos valores do eritrograma, é importante ressaltar a essência da morfologia eritrocitária que se obtém da criteriosa análise citológica efetuada em microscópio. Por mais parâmetros que tenha o mais moderno contador automatizado de células, jamais ele alcançará as centenas de parâmetros que a mente humana de um profissional experimentado poderá realizar.

Outros testes importantes são fundamentais no estabelecimento de causas e consequências de anemias, conforme o exposto na Tabela 50.5.

CLASSIFICAÇÃO DAS ANEMIAS

A classificação das anemias pode obedecer a vários critérios, e entre os mais utilizados na prática laboratorial destacam-se a classificação laboratorial e a classificação fisiopatológica.

A classificação laboratorial da anemia se suporta nos resultados dos índices hematimétricos (VCM e HCM), resultando em três tipos de anemias: normocítica/normocrômica, microcítica/hipocrômica e macrocítica, conforme o esquema (Figura 50.2).

A classificação laboratorial de anemias é, portanto, a forma mais comum na comunicação entre laboratório e médico; entretanto, há de se destacar que nem sempre a anemia normocítica/normocrômica é um indicativo de que os eritrócitos estejam normais em seus tamanhos, formas e cromias.

Na realidade a maioria das anemias normocíticas/normocrômicas tem diversidades morfológicas caracterizadas por macrócitos, micrócitos e poiquilócitos, em que o valor médio do volume eritrocitário (VCM) resulta normal. Da mesma forma a diferença de cromia, por exemplo, micrócitos hipocrômicos e macrócitos normocrômicos, resulta em valor médio de hemoglobina intraeritrocitária (HCM) normal.

Tabela 50.5 Principais análises para determinar causas e consequências de anemias.

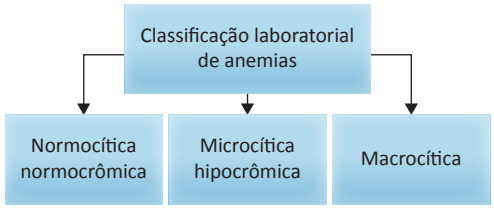
Análises*	Significado
Contagem de reticulócitos	Diminuída: anemias hipoproliferativas Aumentada: anemias hemolíticas, hemorragia aguda Normal: importante realizar mielograma
Ferro sérico	Diminuído: ferropenia Aumentado: sobrecarga de ferro Normal: início de anemia*
Capacidade total de ligação do ferro	Diminuída: neoplasias, nefropatias, hipotransferrinemia* Aumentada: ferropenia Normal: pode ocorrer no início da anemia
Saturação de transferrina	Diminuído: ferropenia Aumentada: anemias hemolíticas e sobrecarga de ferro Normal: anemias por outras causas
Ferritina	Diminuído: ferropenia** Aumentado: Infecções, inflamações, sobrecarga de ferro, anemias hemolíticas, lesões hepáticos e alcoolismo*** Normal: anemias por outras causas que não seja ferropenia ou hemolítica
Eletroforese de hemoglobinas	Alterada: Hb S (doença falciforme e outras variantes) Hb H (talassemia α) Hb A_2 aumentada (tal. β menor) etc. Normal: anemias por outras causas
Dosagem de G6PD	Diminuída: deficiência de G6PD Aumentada: anemias por outras causas Normal: anemias por outras causas

* Em casos de suspeita clínica de anemia.

** Na ausência de inflamações, infecções etc., a ferritina diminui antes da redução do ferro sérico.

*** Por ser a ferritina uma proteína de fase aguda, suas variações são dependentes do estado clínico do paciente.

Fonte: Brain BJ, Gupta RA; 2003.



Eritrócitos	↓	↓/N↑	↓
Hemoglobina	↓	↓	↓
Hematócrito	↓	↓	↓
VCM	N	↓	↑
HCM	N	↓	N
CHCM	N	N/↓	N
RDW	↑	↑	↑

Figura 50.2 Naoum PC, Naoum FA; 2004.

Por fim, em casos de anemia normocítica/normocrômica com alterações morfológicas de eritrócitos, esses fatos devem ser relatados, por exemplo: "anemia normocítica/normocrômica com morfologia eritrocitária composta por micrócitos hipocrômicos, esquisócitos, células em alvo e macrócitos".

O valor de RDW quando associado ao VCM facilita a configuração da morfologia eritrocitária que poderá ser encontrada na análise morfológica, conforme o Quadro 50.1.

Quando se tem informações clínicas do paciente, a classificação laboratorial se torna mais fácil de ser compreendida, porém, nem sempre essas informações são prestadas ao laboratório, conforme a exposição a seguir:

a) **Situações patológicas mais comuns nas anemias normocíticas/normocrômicas**: câncer, doença renal, invasão tumoral da medula óssea, hemorragia aguda, inflamação, anemia hemolítica adquirida, anemia falciforme e fase inicial da deficiência de ferro.

b) **Situações patológicas mais comuns nas anemias microcíticas/hipocrômicas**: deficiência crônica de ferro, hemorragia crônica, talassemias menor, intermédia e maior, S/β talassemia, S/α talassemia e anemia sideroblástica.

c) **Situações patológicas mais comuns nas anemias macrocíticas**: deficiências de vitamina B_{12} e folatos, mielofibrose, doenças hepáticas e anemia megaloblástica, anemia hemolítica com reticulocitose.

Contudo, as anemias classificadas por meio das alterações fisiopatológicas do paciente determinam o que denominamos **classificação fisiopatológica da anemia**, conforme mostra o esquema a seguir (Figura 50.3).

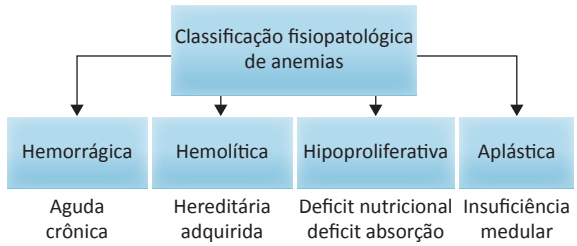


Figura 50.3 Naoum PC, Naoum FA; 2004.

As causas de cada um dos processos que originam as falhas fisiopatológicas são muito variadas, mas as principais são:

- **Hemorragia aguda:** sangramento volumoso, interno ou externo.
- **Hemorragia crônica:** sangramento contínuo, de pequeno volume, nos tratos gastrintestinal, urinário ou reprodutivo.
- **Hemolítica hereditária:** Hemoglobinopatias, enzimopatias e doenças de membrana.
- **Hemolítica adquirida:** malária, queimadura, autoimune, hiperesplenismo, hemoglobinúria paroxística noturna, doença hemolítica do recém-nascido e transfusão ABO incompatível.
- **Hipoproliferativa por déficit nutricional:** deficiências de vitamina B_{12}, ácido fólico ou ferro.

Quadro 50.1 Configuração da morfologia eritrocitária.

RDW	VCM normal	VCM diminuído	VCM aumentado
Normal	Normocitose	Microcitose homogênea	Macrocitose Macropoiquilócitos
Aumentado	Anisocitose Micromacrocítica	Micropoiquilócitos*	Macropoiquilócitos**

* Dacriócitos, microesquisócitos, leptócitos etc.

** Macrócitos policromatófilos (reticulocitose), megalócitos etc.

Fonte: Naoum PC; 1997.

- **Hipoproliferativa por déficit de absorção:** deficiência de receptor celular para vitamina B_{12} (fator intrínseco), deficiência de transferrina, síndrome de má absorção e gastrectomia.
- **Aplástica por insuficiência de produção medular:** destruição do tecido medular por vírus, toxicidade, mieloftise (mielofibrose, mieloma, metástase e leucemia).

De todas as situações apresentadas, as dificuldades mais frequentes se devem à diferenciação laboratorial das duas principais causas das anemias microcíticas e hipocrômicas, ou seja, anemia ferropriva e talassemias α ou β menor.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ANEMIAS MICROCÍTICAS E HIPOCRÔMICAS

O diagnóstico laboratorial das anemias microcíticas e hipocrômicas inicia-se com a avaliação do eritrograma, conforme mostra a Tabela 50.6. O caso 1 exemplifica um eritrograma típico de anemia ferropriva, enquanto o caso 2 exemplifica a anemia microcítica e hipocrômica de talassemia β menor.

As avaliações específicas com a utilização de técnicas que dimensionam o *status* de ferro, as eletroforeses qualitativa e quantitativa de hemoglobinas e a contagem de reticulócitos são capazes de diferenciar a grande maioria dos casos de anemia microcítica e hipocrômica.

O *status* de ferro no processo da investigação laboratorial é composto por três dosagens bioquímicas (ferro sérico, ferritina e capacidade total de ligação do ferro ou CTLF) e uma avaliação obtida por cálculo matemático que resulta na saturação de transferrina (Ferro sérico × 100/CTFL). Por meio do painel de avaliação de ferro sérico, ferritina, CTLF e saturação da transferrina é possível supor as principais causas de anemia microcítica e hipocrômica (Tabela 50.7).

Muitas vezes, entretanto, os resultados da avaliação do *status* de ferro não conseguem identificar a causa da anemia microcítica e hipocrômica. Nessas situações as eletroforeses qualitativas e quantitativas de hemoglobinas podem auxiliar a definição do diagnóstico. A consulta à Tabela 50.6 facilita essa interpretação.

A contagem de reticulócitos auxilia o diagnóstico laboratorial da anemia microcítica e hipocrômica. Nas situações decorrentes da deficiência de ferro e na anemia sideroblástica, os valores de reticulócitos se situam abaixo da normalidade (< 0,5%). Nas talassemias α e β menor é comum observar discreta reticulocitose (> 2,5% a 3,5%). Nas talassemias interativas (tal. β/Hb S e tal. β/Hb C) há evidente reticulocitose (> 3,5%). Nos casos por intoxicação de chumbo a contagem de reticulócitos pode estar normal, porém é mais frequente a sua diminuição.

Finalmente, o diagnóstico diferencial para anemia microcítica e hipocrômica em pessoas intoxicadas pelo chumbo se faz por meio da dosagem de chumbo sanguíneo. Para a

Tabela 50.6 Eritrogramas típicos de anemia ferropriva (caso 1) e talassemia β menor (caso 2), independentemente de sexo e idade.

	Caso 1		Caso 2	
Eritrócitos (/mm³)	4.000.000	(↓)	5.000.000	(N)
Hematócrito (%)	30	(↓)	34	(↓)
Hemoglobina (g/dL)	10	(↓)	10	(↓)
VCM (fL)	75	(↓)	68	(↓)
HCM (pg)	25	(↓)	20	(↓)
CHCM (g/dL)	33	(N)	29	(N)
RDW (%)	17	(↑)	17	(↑)
Morfologia comum	Anisocitose Poiquilocitose Micrócitos Leptócitos Células-alvo Hipocromia		Anisocitose Poiquilocitose Micrócitos → Esquisócitos → Dacriócitos Células-alvo Hipocromia → Pontilhados basófilos	

Observação: As setas (→) indicam os principais diferenciadores citológicos, comuns em portadores de talassemias.
Fonte: Naoum PC; 1997.

anemia sideroblástica é comum os procedimentos da coloração dos eritrócitos e eritroblastos de esfregaços de sangue medular com o corante azul da Prússia.

Tabela 50.7 Painel de avaliação do *status* de ferro das principais anemias microcíticas e hipocrômicas.

Causas	Painel do *status* de ferro			
	Ferro sérico	Ferritina	CTLF	Saturação*
Def. ferro	D	D	N/A	D
Inflamação + Def. ferro	D	A	N/D	D
Talassemias	N	N/A	N	N/A
Sideroblástica	N	N/A	N	N/A

A = aumentado, D = diminuído, N = normal.
* Índice de saturação da transferrina, ou saturação da transferrina.
Fonte: Naoum PC, Naoum FA; 2004.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS HEMOGLOBINOPATIAS

Introdução

As alterações das hemoglobinas envolvem a síntese estrutural e quantitativa dos aminoácidos que compõem as diferentes cadeias de globinas, bem como as moléculas e enzimas que participam da formação do grupo heme.

As alterações que envolvem as globinas se devem às modificações nos genes responsáveis pelo sequenciamento e estrutura de cada tipo de polipeptídeo de globina, bem como naqueles destinados à regulação quantitativa da síntese equilibrada entre as globinas α e não α (β, δ e γ). Quando um determinado gene apresenta uma de suas bases nitrogenadas substituída por outra diferente, resulta na formação de moléculas de hemoglobinas com características bioquímicas alteradas em relação às hemoglobinas normais, e são por isso denominadas hemoglobinas variantes. Por exemplo, a hemoglobina S se deve à introdução do aminoácido valina (Val) no lugar do ácido glutâmico (Glu) na posição número 6 da cadeia polipeptídica da globina β por meio de um processo conhecido por mutação. Essa anormalidade se deve a uma troca da base nitrogenada adenina (A) pela timina (T), conforme a sequência representada a seguir:

Aminoácidos	5		6		7
Bases nitrogenadas da globina βA	CCT	—	GAG	—	GAG
Aminoácidos da globina βA	Pro		Glu		Glu
Bases nitrogenadas da globina βS	CCT	—	CTC	—	GAG
Aminoácidos da globina βS	Pro		Val		Glu

As mutações que afetam o controle dos genes para as sínteses equilibradas entre as globinas α e não α são muito diversificadas. Em geral, essas mutações provocam diminuições no volume de síntese de uma das globinas com intensidades variáveis, ou até mesmo ausência de síntese. Nesses casos, ocorrem desequilíbrios do conteúdo entre a globina produzida normalmente e a alterada. Quando a mutação bloqueadora de síntese de globina atinge, por exemplo, o gene α (talassemia α), há diminuição do conteúdo de globina α dentro das células eritroides, enquanto a síntese de globina β se faz normalmente. Essa diferença de síntese entre globinas α e β promove o desequilíbrio entre elas, e as consequências fisiopatológicas são proporcionais ao tamanho do desbalanceamento ocorrido.

Dessa forma, conceitualmente se denominam hemoglobinas variantes aquelas que apresentam estrutura química diferente da sua hemoglobina normal correspondente (A, A_2 ou Fetal), motivada pela mutação de uma ou mais bases nitrogenadas que resultam na substituição de um ou mais aminoácidos nas globinas α, β, δ ou γ. As hemoglobinas anormais são aquelas consideradas variantes, bem como as hemoglobinas normais com alterações quantitativas, por exemplo: Hb A_2 elevada, Hb Fetal elevada, Hb A_2 diminuída. As talassemias consistem em um conjunto de síndromes motivadas principalmente por alterações de sínteses quantitativas de globinas α e β, causando desequilíbrio entre elas e variáveis graus de anemias hemolíticas, além de várias outras consequências patológicas. As hemoglobinopatias são designações destinadas às hemoglobinas variantes que causam anemia hemolítica, policitemia, cianose ou falcização.

Finalmente, há as hemoglobinas anormais e hemoglobinopatias não hereditárias, que representam um grupo restrito de alterações das hemoglobinas normais causadas por agentes indutores, e são também conhecidas como formas adquiridas. Dentre as hemoglobinas anormais não hereditárias, destacam-se a Hb A_2 diminuída nas ferropenias, a Hb A_2 aumentada na malária, no diabetes e na doença de Chagas; a Hb Fetal elevada em certas doenças mieloides, em transplantados renais, em portadores de HIV ou por uso de determinadas drogas, e a Hb H adquirida nas doenças linfo e mieloproliferativas. Em contrapartida, as hemoglobinopatias não hereditárias mais comuns são as metahemoglobinas elevadas por indução de drogas oxidantes (sulfa e derivados, nitritos, anilina etc.), gases e solventes oxidantes.

O grupo heme é tão importante quanto a globina por duas razões: como agente que coloca o oxigênio à disposição da célula, que a ativa e transfere elétrons, e pelo fato de ser um pigmento corado que possibilita o estudo da diferenciação e maturação dos precursores eritrocitários. Assim, alterações das enzimas que participam das transformações dos compostos químicos envolvidos na síntese do anel de porfirina, para compor com o ferro o grupo heme, dão origem às porfirias e protoporfirias eritropoéticas.

HEMOGLOBINAS VARIANTES

A maioria das variantes estruturais é originada por simples substituições de aminoácidos, resultantes de mudanças nas sequências de nucleotídeos. As alterações estruturais, com consequências nas atividades físico-químicas da molécula, estão na dependência da extensão do processo mutacional e dos locais em que esses ocorrem. Dessa forma, as hemoglobinas variantes podem originar-se por:

a) Substituição de um aminoácido por outro, de características diferentes, na superfície externa da molécula. Pode ocorrer também a substituição de dois aminoácidos por outros dois, em uma mesma cadeia, sendo, entretanto, condição muito rara. As substituições de aminoácidos na superfície externa, com exceção feita às Hb S, Hb C e Hb E, não produzem alterações significantes no funcionamento da molécula. Nesse grupo estão cerca de 650 tipos de Hb variantes não patológicas (p. ex.: Hb O, Hb J, Hb I, Hb N, Hb D etc.). Substituições de aminoácidos na superfície interna da molécula, envolvendo resíduos polares e não polares, tem ocorrido preferencialmente nos locais invariantes da molécula, incluindo aqueles que fazem parte do "pacote" do grupo heme, cuja principal função é protegê-lo da entrada de água, bem como dos aminoácidos que participam dos contatos $\alpha_1\ \beta_1$. Qualquer substituição na superfície interna causa instabilidade molecular, geralmente iniciando-se pela oxidação do grupo heme com a formação excessiva de metahemoglobina e precipitação da globina instável. Citologicamente é possível observar a precipitação intraeritrocitária da globina instável por meio da presença de corpos de Heinz. Nesse grupo estão cerca de 350 tipos diferentes de Hb instáveis.
b) Substituições de aminoácidos que participam dos contatos $\alpha_1\ \beta_1$, das ligações químicas com o 2,3 DPG, e do resíduo histidina C-terminal da cadeia β, que promovem a formação de hemoglobinas variantes com alterações na sua afinidade pelo oxigênio. São poucas as Hb variantes com afinidade aumentada ou diminuída por oxigênio. As que tem afinidade aumentada se destacam por eritrocitoses, enquanto aquelas com afinidade diminuída manifestam-se notadamente por anemia hemolítica.
c) Substituição dos resíduos de histidina distal ou proximal, que estão ligados ao grupo heme, causam anormalidades que se caracterizam pela oxidação espontânea e contínua do ferro, com formação excessiva de metahemoglobina, fato que dá origem às hemoglobinas variantes do tipo M (Hb M). Os portadores de Hb M são sempre cianóticos, com ou sem anemia.
d) Adição de um ou mais aminoácidos ao último aminoácido (C-terminal) das globinas α e β, tornando-as longas e manifestando-se como fenótipos talassêmicos α e β.
e) Fusão entre duas cadeias de globinas diferentes, em especial das cadeias δ-β que resultam na formação da hemoglobina variante conhecida por Hb Lepore. A fusão inversa, ou seja, β-δ é conhecida por Hb anti-Lepore. Outras fusões têm sido descritas na literatura e todas essas ocorrências se devem ao *crossing-over* desigual no pareamento dos cromossomos 11.

Assim, somam-se atualmente perto de 1.000 variantes estruturais, poucas delas associadas com manifestações clínicas e alterações hematológicas, que podem ser agrupadas em:

- Hemoglobinas de agregação;
- Hemoglobinas sem alterações fisiológicas;
- Hemoglobinas instáveis;
- Hemoglobinas com alterações funcionais;
- Hemoglobinas com fenótipos talassêmicos.

As hemoglobinas de agregação formam tactoides e cristais, com repercussões clínicas e laboratoriais variáveis. As hemoglobinas S e C participam desse grupo.

As hemoglobinas variantes que não causam alterações funcionais são a maioria, perto de 650 tipos diferentes, e embora apresentem importância bioquímica, genética e antropológica, não produzem efeitos clínicos e laboratoriais significantes.

As hemoglobinas instáveis apresentam graus variáveis de manifestações clínicas e hematológicas, expressando-se laboratorialmente de forma diversificada entre os diferentes tipos descritos na literatura.

As hemoglobinas com alterações funcionais causam metahemoglobinas por Hb M, cianose e alteração de afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.

As hemoglobinas com fenótipos talassêmicos são as variantes provocadas por falhas no processo de regulação da síntese de globina pela adição de aminoácidos ao C-terminal das globinas α e β e pelo pareamento desigual do cromossomo 11 no processo da mitose celular.

As Tabelas 50.8 e 50.9 resumem algumas das hemoglobinas variantes relacionadas com os defeitos estruturais, os genótipos, seus efeitos nos eritrócitos, além de doenças específicas causadas por estas hemoglobinas.

A seguir apresentamos um resumo das principais hemoglobinas variantes encontradas na nossa população.

- **Hemoglobina C (Hb C)** – Foi descrita pela primeira vez por Itano e Neel em 1950, e em 1958 Hunt e Ingram identificaram que o aminoácido número 6 da globina β, o ácido glutâmico (Glu), havia sido substituído pela lisina (Lis). Devido à diferença de carga elétrica envolvida (Glu, pI = 3,22 → Lis, pI = 9,74), a globina β^C tornou-se muito menos negativa, fato que sua mobilidade é muito lenta em eletroforese alcalina quando comparada com Hb A, S, Lepore ou Fetal. Dentre as hemoglobinas variantes, o genótipo heterozigoto da Hb C, ou Hb AC, é o segundo mais prevalente após a Hb AS na população brasileira, variando entre 0,3% e 1,0%. A homozigose da Hb C (ou Hb CC) é rara e é

Tabela 50.8 Exemplos de hemoglobinas variantes estruturais e seus efeitos fisiopatológicos.

Hb variante	Defeito estrutural	Genótipos	Efeitos nos eritrócitos
S	β 6 Glu → Val	SS, SF, SD, SC, SH	Falcização
C	β 6 Glu → Lis	CC, CF, SC	Cristais de Hb
E	β 26 Gli → Lis	EE	Hemólise
Koln(1)	β 96 Val → Met	A + Koln	Heinz e hemólise
Niterói(1)	β 44 a 46 deletados	A + Niterói	Heinz e hemólise
Malmo(2)	β 97 His → Glu	A + Malmo	Eritrocitose
Kansas(3)	β 102 Asn → Tre	A + Kansas	Meta-hemoglobina
Lepore	fusão δ-β	A + Lepore	Microcitose
Kenya	fusão γ-β	A + Kenya	Nenhuma
B_2(4)	δ 16 Gli → Arg	A + B_2	Nenhuma
F Texas(5)	γ 5 Glu → Lis	A + F Texas	Nenhuma

(1) Há vários tipos de hemoglobinas instáveis; (2) Há vários tipos de hemoglobinas com afinidade aumentada por O_2; (3) Há poucos tipos de hemoglobinas com afinidade diminuída por O_2; (4) Há vários tipos de variantes de Hb A_2 por mutação na globina δ; (5) Há vários tipos de variantes de Hb Fetal, somente detectáveis em sangue de recém-nascidos.

Fonte: Naoum PC; 1997.

Tabela 50.9 Doenças causadas por hemoglobinas variantes estruturais.

Anemia hemolítica e oclusão vascular falcizante

- Hb SS, Hb SS/Tal. α, Hb SS/PHHF
- Hb SD, Hb SC
- Hb S/Tal. β

Anemia hemolítica com excreção urinária de dipirróis

- Hemoglobinas instáveis: Hb Koln, Hb Duarte, Hb Zurique, Hb Genova, Hb Seattle, Hb Niterói etc.

Eritrocitose hereditária

- Hemoglobinas com afinidade aumentada por O_2:
  - Hb Chesapeake, Hb Malmo, Hb Kempsey, Hb Hiroshima etc.

Meta-hemoglobina hereditária e cianose

- Hemoglobina M (Boston, Iwate, Milwaukee, Hyde Park, Saskatoon)

Outras formas de cianose hereditária

- Hb variante com afinidade diminuída por O_2: Hb Kansas

Anemia microcítica e hipocrômica

- Talassemias β interativas com Hb variantes:
  - (Hb S/Tal. β, Hb C/Tal. β, Hb D/Tal. β)
  - Hb Lepore (fusão de globinas δ-β)
  - Hb *Constant Spring* (alongamento da globina α)

Fonte: Naoum PC; 1997.

caracterizada por anemia hemolítica de intensidade variável, com evidências clínicas de cansaço, fraqueza e, eventualmente, esplenomegalia. Laboratorialmente a hemoglobina total oscila entre 9 e 12 g/dL, hematócrito entre 30% e 40%, leve a moderada reticulocitose (3% a 7%) e no esfregaço sanguíneo há muitas células em alvo. Eletroforeticamente, a homozigose da Hb C tem concentração de 98% desta hemoglobina em pessoas com idade superior a seis meses. Outras condições associadas de Hb C com manifestações clínicas são a doença falciforme por Hb SC e a interação entre Hb C e talassemia β, ou Hb C/Tal. β, cuja avaliação eletroforética se torna visível pela Hb CF. Diferentemente da Hb CC, que não se detecta Hb Fetal com níveis acima do normal, na Hb C/Tal. β a Hb Fetal geralmente está elevada (> 5%). Nesses casos as evidências clínicas são marcadas por palidez, cansaço e esplenomegalia. Laboratorialmente a anemia é moderada (Hb: 9 a 10 g/dL) do tipo microcítica, hipocrômica, muitas células em alvo e reticulocitose acima de 5%.

- **Hemoglobina D (ou Hb D)** – A Hb D é uma hemoglobina variante que apresenta a mesma mobilidade da Hb S em eletroforese de pH alcalino. É separável da Hb S por eletroforese em ágar pH ácido (pH 5 a 6), e também por não se insolubilizar em soluções redutoras de oxigênio. Quando associada à Hb A, a heterozigose de Hb AD, o portador é totalmente assintomático, e a fração anormal constitui-se entre 30% e 50% da hemoglobina total. A prevalência de portadores de Hb AD no Brasil é por volta de 1 caso para cada 5 mil pessoas analisadas. Casos de homozigoses de Hb D (Hb DD) são raríssimos, e podem estar associados a discreto grau de anemia (Hb: 10,5 a 12,0 g/dL). Para estabelecer o diagnóstico de homozigose deve-se excluir cuidadosamente, por estudos familiares, a interação da Hb D com a talassemia β. Nesse caso específico de Hb D/Tal. β é comum evidenciar no hemograma anemia microcítica e hipocrômica, com hemoglobina total variável de 9,5 a 12 g/dL, VCM abaixo de 77 fL e HCM também abaixo de 27 pg. Situação que oferece dificuldade no diagnóstico laboratorial ocorre quando há associação entre hemoglobinas S e D, ou Hb SD, caracterizando um dos tipos que compõem o grupo das doenças falciformes. Neste caso específico, a eletroforese de hemoglobina em pH alcalino não diferencia o genótipo SS da SD, bem como o teste de falcização que é positivo em ambos. O teste mais adequado para a diferenciação se faz por meio de eletroforese em agarose de pH ácido: a Hb S é mais lenta que a Hb D, que se posiciona igual à Hb A.

Após ter sido descrita em 1953, várias outras hemoglobinas que se posicionavam como a Hb D (e não falcizavam) foram estruturalmente diferenciadas conforme o tipo de substituição de aminoácidos. Assim surgiram as Hb D Los Angeles ou Punjab (a mais frequente entre todas as hemoglobinas variantes que migram na mesma posição da Hb S), Hb D Iran, Hb D Ibadan etc., todas na posição de Hb S. Atualmente, há dezenas de hemoglobinas variantes que migram na posição de S ou D e que foram denominados por local de origem e que são diferenciadas em eletroforeses em ágar ácido, isofocalização, HPLC, e por biologia molecular. A Tabela 50.10 mostra a relação de hemoglobinas que migram na mesma posição de Hb S em pH alcalino, e suas diferenciações estruturais.

- **Hemoglobina G (ou Hb G):** É um grupo de hemoglobinas variantes que migram pouco atrás da Hb S nas eletroforeses alcalinas em acetato de celulose e agarose. A diferenciação se faz por meio de eletroforese em agarose ácida. Dentre as hemoglobinas do tipo G, destacam-se Hb G Audhali (α 23 Glu → Val), Hb G Waimanalo (α 64 Asp → Asn), Hb Filadelfia (α 68 Asn → Lis), Hb G Galveston (β 43 Glu → Ala), Hb G Copenhagen (β 47 → Asn), Hb G Accra (β 79 Asp → Asn), dentre outras. A Hb G Filadelfia é a mais frequente entre todos os tipos de Hb G, em especial no Brasil e EUA, pois sua origem é africana. Tem baixa prevalência na população brasileira (cerca de 1:15000), porém, por ser comum entre pessoas de descendência africana e se situar eletroforeticamente na região da Hb S em eletroforese alcalina, sua avaliação é sempre importante. Por ser a Hb G Filadelfia uma mutante de globina α, geralmente afetando um dos quatro genes α, sua concentração é quase sempre abaixo de 25%.
- **Hemoglobina Lepore (ou Hb Lepore):** A Hb Lepore é uma hemoglobina variante, com migração similar à Hb S (ver Tabela 50.9), causada por um pareamento desigual do cromossomo 11 durante a meiose. Como consequência dessa desigualdade na posição das cromátides irmãs do cromossomo 11, o *cross-over* entre elas promove a fusão de uma parte do gene δ com outra do gene β, formando um gene híbrido δ-β, além dos genes δ, γ e β. Esse gene híbrido δ-β sequencia globinas em que a parte inicial é formada por aminoácidos da globina δ e a parte final por aminoácidos da globina β, conforme mostra o esquema a seguir (Figura 50.4).

Dependendo do local em que ocorre a fusão δ-β, a Hb Lepore pode originar pelo menos três subtipos: Lepore Boston, Lepore Baltimore e Lepore Holanda. Todas apresentam as mesmas características laboratoriais e eletroforéticas, sendo diferenciadas por estudos de composição peptídica. A concentração da Hb Lepore em eletroforese alcalina é variável entre 5% e 15%, com Hb A_2 normal ou diminuída; algumas vezes a Hb Fetal pode estar elevada. Nesses casos, o quadro hematológico laboratorial é típico de talassemia β menor com anisopoiquilocitose, microcitose e hipocromia. Situação mais grave ocorre na homozigose da Hb Lepore, com quadro clínico e laboratorial semelhante à talassemia maior ou intermédia. A eletroforese de hemoglobina alcalina nas pessoas com Hb Lepore homozigota mostra a presença de Hb Fetal e Hb Lepore com concentrações elevadas.

Tabela 50.10 Relação das principais hemoglobinas variantes que migram na posição de Hb S em eletroforese de pH alcalino, que são raríssimas e menos frequentes que Hb D Los Angeles.

Hemoglobina	Mutação	Concentração (%)	Agarose ácida**	Outras informações
Memphis	α 23: Glu → Gln	< 30	S	
Hasharon	α 47: Asp → His	< 15	S	Instável
Seally	α 47: Asp → His	< 20	A	
Arya	α 47: Asp → Asn	< 20	A	
Montgomery	α 48: Leu → Arg	< 20	A	
Russ	α 51: Gli → Arg	< 15	A	
Persepolis	α 64: Asp → Tir	< 20	C	
Daneshgah	α 72: His → Arg	< 30	A	
D Bushman	β 16: Gli → Arg	25–40	A	
D Iran	β 22: Glu → Gln	25–40	A	
Alabama	β 39: Glu → Lis	25–40	A	
Ocho-Rios	β 52: Asp → Ala	25–40	C	
Osu-Christianborg	β 52: Asp → Asn	25–40	A	
Korle-Bu	β 73: Asp → Asn	25–40	A	
P	β 117: His → Arg	>40	A	Hipocromia
D Los Angeles	β 121: Glu → Gln	25–40	A	
D Beograd	β 121: Glu → Val	25–40	A	
S-Antilhas*	β 23: Val → Ile	25–40	A	
S-Providence*	β 82: Lis → Asn	25–40	A	
S-Oman*	β 121: Glu → Lis	25–40	A	
S-Travis*	β 142: Ala → Val	25–40	S ≠ A	
Lepore	Fusão δ – β	< 20	A	Microcitose + Hipocromia

* Duplas mutações na globina β; além das mutações apresentadas, todas tem a mutação da Hb S (β6 Glu → Val).

** Posição eletroforética similar; ≠ entre Hb A e Hb S.

Fonte: Naoum PC; 1997.

Figura 50.4 Mapa representativo dos principais genótipos de hemoglobinas, em eletroforeses de pH alcalino e ácido.

Fonte: Naoum PC; 1997.

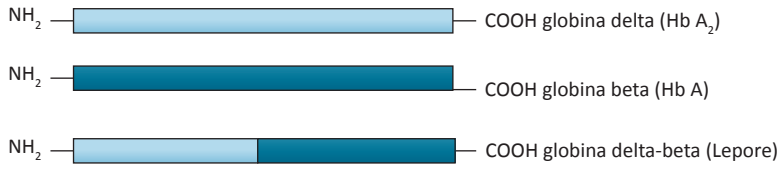


Figura 50.5 Esquema que representa a fusão entre polipeptídeos de globinas β e δ que resulta na Hb Lepore.
Fonte: Provan D, Griubenn J; 2000.

- **Outras hemoglobinas raras:** Dentre outras hemoglobinas raras que foram identificadas em nossa população, destacam-se as seguintes: N, J (Oxford, Rovigo e Baltimore), I, Porto Alegre, Korle-Bu, e Hb Instáveis (Malmo, Koln, Hasharon etc.). Entretanto, por não terem coincidências em migrações eletroforéticas com a Hb S, ou interações de importância hematológica, não há a necessidade de relatá-las com detalhes para o propósito deste livro.

TALASSEMIAS

As talassemias são um grupo heterogêneo de doenças genéticas causadas pela redução da síntese de globinas α e não α (β, δ ou γ). Na realidade as formas mais comuns de talassemias se devem à redução de globina α ou de globina β, situações que originam as talassemias α ou β, respectivamente. Situações mais raras envolvem a redução de síntese conjunta de globinas δ e β (talassemia δ β), ou de δ, β e γ (talassemia δ β γ). Em alguns casos de talassemias há redução total de síntese de globina α ou de β, caracterizando as talassemias α^0 ou β^0, respectivamente, em contrapartida, quando a redução de síntese é parcial denominam-se talassemias α^+ ou β^+. A talassemia β e as hemoglobinas S, C e E são as mais prevalentes respectivamente nos continentes europeu, africano e asiático, e por isso não é raro a ocorrência de interações entre talassemias e essas hemoglobinas variantes: Hb S/Tal. β^0; Hb S/Tal. β^+, Hb C/Tal β, Hb S/Tal. α e Hb E/Tal. α. As combinações entre genes talassêmicos com Hb S, principalmente, produzem grande diversidade clínica dessa doença genética, com variações que causam desde a morte fetal intra-útero até situações assintomáticas.

A maioria das talassemias obedecem ao modelo de herança Mendeliana, caracterizado pela falta de sintomas clínicos nos heterozigotos e pela gravidade clínica nos homozigotos. Assim, clinicamente, as talassemias podem ser classificadas em maior, intermédia, menor e mínima (Tabela 50.11). Para melhor exposição das talassemias apresentamos separadamente as talassemias α e β.

TALASSEMIA α

Entre todas as doenças das hemoglobinas a talassemia α é a mais prevalente em quase todos os continentes. Está amplamente distribuída nos países banhados pelo mar Mediterrâneo, Oeste da África, Oriente Médio, Índia, Sudeste da Ásia, China, Tailândia, Malásia e Indonésia. Recentemente, com a introdução de técnicas eletroforéticas mais sensíveis, foi possível determinar que a talassemia α também é comum no Brasil. Entretanto, as formas mais graves de talassemias α estão restritas ao sudeste da Ásia e a algumas ilhas do Mediterrâneo. Para que se possa entender essa ampla difusão mundial do gene α talassêmico e ao mesmo tempo a restrição regional das formas graves da doença, é necessário conhecer a genética da doença.

Tabela 50.11 Classificação clínica das talassemias.

Alterações clínico-laboratoriais	Talassemias			
	Maior	Intermédia	Menor	Mínima
Hb (g/dL)	< 7	7 – 10	10 – 13	11 – 15
Reticulócitos (%)	2 – 15	2 – 10	2 – 5	1 – 2
Eritroblastos	+++	++/+	–	–
Aniso-poiquilocitose	++++	+++	++/+	+/–
Icterícia	++	+/–	–	–
Esplenomegalia	+++	++	+/–	–
Alterações ósseas	+++	++	–	–
Dependência de transfusões	+++	+/-	–	–

+ pouco; ++ moderado; +++ acentuado; ++++ muito acentuado; – ausente.
Fonte: Naoum PC; 1997.

- **Variabilidade genética e laboratorial da talassemia α:** Os genes que sintetizam globinas α estão no cromossomo 16 e são dois genes por cromossomo. As diferentes formas de talassemias α estão relacionadas com a inativação dos genes de globinas α: quando os dois genes α do cromossomo 16 estão inativados denomina-se por talassemia α^0, e quando apenas um gene α do cromossomo 16 está afetado designa-se por **talassemia** α^+ (Figura 50.6). Pela análise da representação esquemática observa-se que há duas formas de traço α talassêmico (ou talassemia α heterozigota), ambas assintomáticas, porém caracterizadas pela presença de Hb H (tetrâmeros de globinas β, ou β_4) em eletroforese alcalina de hemoglobina. Da mesma forma há situações patológicas quando três genes α estão afetados pela redução de síntese de globina (doença de Hb H), ou de quatro genes α afetados (α^0/α^0) na síndrome da hidropsia fetal, conforme mostra a Tabela 50.11. As deleções que resultam em talassemia α são muito variadas e, consequentemente, a base molecular dessas talassemias é complicada, notadamente na talassemia α^+, pois a extensão dessa lesão parcial do gene é muito variável. Sob o ponto de vista de distribuição geográfica, a talassemia α^0 é particularmente comum no Sudeste da Ásia e em algumas ilhas do mar Mediterrâneo, regiões em que a doença de Hb H e a síndrome da hidropsia fetal são mais comuns. No Brasil prevalece a talassemia α^+ caracterizada pelo portador silencioso em 10% a 20% da população e traço α talassêmico em 1% a 3% da população (Tabela 50.12).
- **Fisiopatologia da talassemia α:** A deficiência na síntese de globina α resulta basicamente em dois grupos de efeitos patológicos com consequências fisiopatológicas e eritrocitárias (Figura 50.7). As Hb H e Hb Bart's são más transportadoras de oxigênio, pois têm afinidade dez vezes maior que a Hb A, não desenvolvem o efeito Bohr (controle da dissociação do oxigênio) e nem a interação dos grupos heme, resultando em hipóxia tecidual com gravidades proporcionais ao grau de lesão do gene α. Por serem instáveis, as Hb H (β_4) e Hb Bart's (γ_4) se precipitam no eritrócito e liberam o ferro, causando oxidações com geração de radicais livres que atacam a camada lipoproteica da membrana (lipoperoxidação). Esse processo deforma os eritrócitos, alterando também a sua morfologia, fatos que, somados à oxidação da proteína Banda 3 da membrana, permitem o reconhecimento imunológico dos macrófagos do sistema reticuloendotelial (SRE), causando o hiperesplenismo e a precoce destruição dos eritrócitos, e por fim a anemia. Esse processo é contínuo e dependente da extensão da lesão do gene α, resultando em anemia e eritropoese acelerada, que ao longo do tempo causa a expansão da medula e deformidades ósseas.

TALASSEMIA β

A talassemia β é a forma mais importante de talassemias devido aos graus de morbidade e mortalidade causadas pelas consequências das intensidades de anemia hemolítica que afeta especialmente os doentes com talassemias β intermédia e maior. Os constantes avanços terapêuticos e preventivos direcionados aos pacientes com talassemia β maior têm aumentado a sobrevida com qualidade, com políticas públicas de apoio aos doentes e familiares em vários países, inclusive no Brasil. A talassemia β está amplamente distribuída por todos os continentes, com significativa prevalência na Itália, Chipre, Grécia e países do Oriente Médio, locais em que a prevalência do gene β talassêmico varia entre 2% e 30%. No Brasil, a talassemia β menor oscila entre 0,5% e 1,5%, e por ano nascem entre 300 e 350 crianças com talassemia β maior.

- **Variabilidade genética e laboratorial da talassemia β**: Conforme foi apresentado no capítulo das hemoglobinas normais, os genes que sintetizam globinas β estão nos cromossomos 11, sendo um gene β por cromossomo. Há dois tipos de lesões genéticas no gene da globina β, quais sejam: a) lesão que afeta integralmente o gene de globina β, com redução total de síntese, e denominada talassemia β^0; b) lesão que afeta parte do gene da globina β, com redução parcial de sua síntese, e caracterizada por talassemia β^+ (Figura 50.8). Laboratorialmente as talassemias β homozigotas (β^0/β^0, $^+/\beta^+$ ou β^0/β^+) são todas graves, com graus acentuados

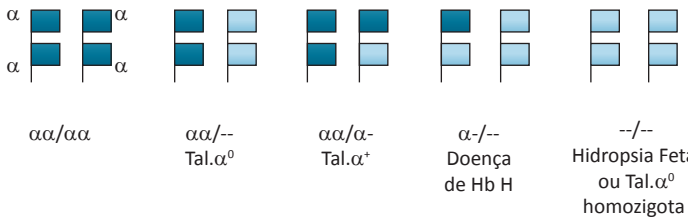


Figura 50.6 Representação esquemática de genes α normal e nas talassemias α^0 e α^+, nos pares de cromossomos 16.
Fonte: Naoum PC; 2005.

Tabela 50.12 Síndromes α talassêmicas. Sinopse geral da relação entre deleção dos genes α e consequências fisiopatológicas.

Tipo de talassemia	Deleção do gene	Alterações hematológicas	Alterações clínicas	Alterações laboratoriais
Portador silencioso	(-, / α,α)	Discreta microcitose ou normocitose VCM: 75-80 HCM: 24-27	Nenhuma Talassemia mínima	Traços de Hb H (< 2%) na eletroforese P.I.E. de Hb H: 1/1.000 a 2.000
Traço α talassêmico	(-,- / α,α) ou (-,α / -,α)	Microcitose Hipocromia Anemia (Hb: 11-13 g/dl) VCM: 65-75 HCM: 20-24	Geralmente assintomático Talassemia menor	Hb H: 2%–8% P.I.E. de Hb H: 1/250 a 500
Doença de Hb H	(-,- / -,α)	Microcitose Hipocromia Anemia (Hb: 8-11 g/dL) VCM: 55-65 HCM: 20-24	Talassemia intermédia Anemia moderada, icterícia, esplenomegalia	Hb H: 10-20% P.I.E. de Hb H: Presença de Hb H em todos os campos do microscópio (1:10 a 1:50)
Hidropsia fetal	(-,- / -,-)	Anisocitose Poiquilocitose Eritroblastose Anemia (Hb: < 7 g/dL) VCM: 100-110 HCM: diminuído	Morte neonatal com eritroblastose fetal	Hb Bart's: 80%-100% Hb H: 10%-20% P.I.E. de Hb H: Idem ao da Doença de Hb H

P.I.E.: Pesquisa intraeritrocitária, relacionado a proporção de uma célula com Hb H para determinado número de eritrócitos.
Fonte: Bain BJ, Gupta RA; 2003.

de anemia, dependentes de transfusão de eritrócitos, e muitos efeitos fisiopatológicos. Em contrapartida, a talassemia β heterozigota ou menor, independentemente do genótipo, é clinicamente assintomática, e se manifesta laboratorialmente por anemia microcítica e hipocrômica de grau leve, com alterações morfológicas dos eritrócitos (esquisócitos, micrócitos, dacriócitos e pontilhados basófilos), e bilirrubina indireta com discreta elevação. A Tabela 50.13 resume as principais alterações das talassemias β. Os defeitos moleculares que causam os diferentes haplótipos da talassemia β são pelo menos 170 tipos de mutações, quer sejam por transcrição, processamento de RNAm, translação ou instabilidade pós-translação no gene da globina β. Os estudos moleculares têm especial interesse antropológico, e ainda não foi possível relacioná-los eficientemente com a clínica das talassemias β maior e intermédia.

- **Fisiopatologia da talassemia** β: O processo fisiopatológico da talassemia β está relacionado com o desequilíbrio que se verifica entre a síntese de globinas α e β. Com a síntese de globina β afetada por redução parcial (β^+) ou total (β^0), a relação α/β supera o valor de equilíbrio que é de 1,0. A globina α, que não teve sua síntese alterada, apresenta produção normal, e como não há globina β suficiente para formar tetrâmeros $\alpha_2\beta_2$ resultará na precipitação de globinas α livres nos eritroblastos. Essa precipitação causa situações patológicas intraeritrocitárias, deformando os eritrócitos, que são retirados precocemente da circulação pelo SRE, causando anemia hemolítica e esplenomegalia. A hemoglobina predominante nos eritrócitos da talassemia β maior é a Hb Fetal, que tem elevada afinidade por oxigênio e por isso induz a hipóxia tecidual, fato que desencadeia vários efeitos patológicos orgânicos, conforme mostra a Figura 50.9.

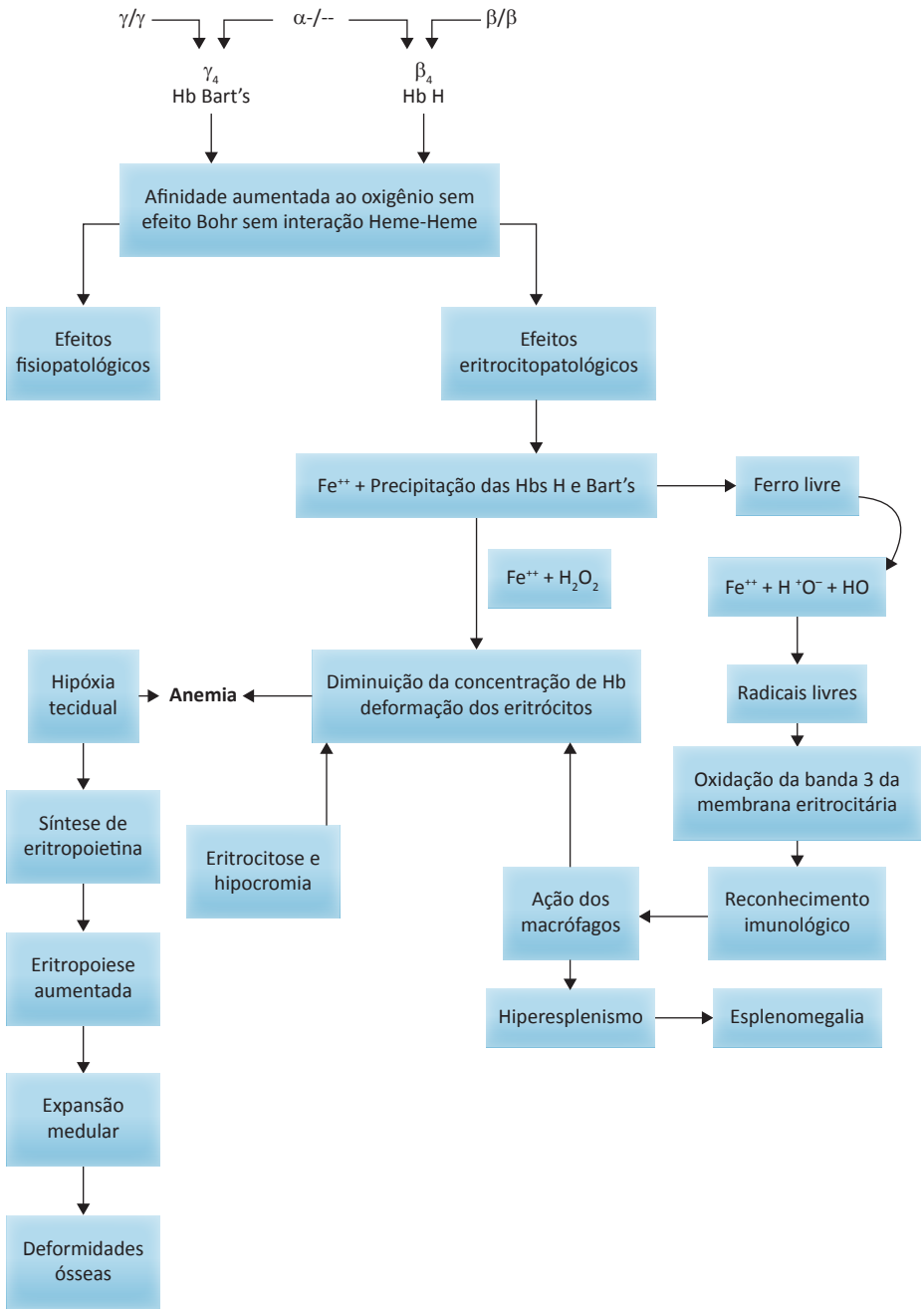


Figura 50.7 Esquema representativo dos principais efeitos fisiopatológicos e eritrócitopatológicos na talassemia α na doença de Hb H.
Fonte: Naoum PC; 2005.[12]

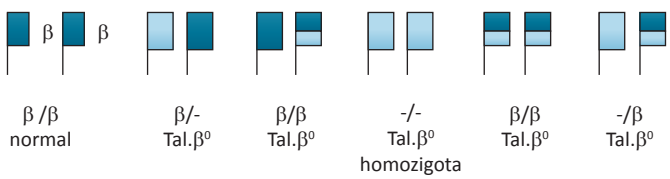


Figura 50.8 Representação esquemática de genes β normal e nas talassemias β^0 e β^+, nos pares de cromossomo 11.
Fonte: Naoum PC; 1997.

Tabela 50.13 Resumo das principais alterações nas talassemias β heterozigota e homozigota.

Talassemias	Alterações		
	Clínicas	Laboratoriais	Eletroforéticas
β^+ heterozigoto	Discreto grau de anemia	Hb: 10-13 g/dL Microcitose (+) Hipocromia (+)	Hb A_2 > 4% Hb Fetal: 0%-5%
β^0 heterozigoto	Discreto grau de anemia	Hb: 10-13 g/dL Microcitose (+) Hipocromia (+)	Hb A_2 > 4% Hb Fetal: 0%-5%
β^+ homozigoto	Tal. intermédia ou maior (dependente de transfusão)	Hb: 7-10 g/dL Anisocitose (+++) Hipocromia (+++)	Hb A: 60%-80%* Hb A_2: 2%-6% Hb Fetal: 20%-40%
β^0 homozigoto	Tal. maior (dependente de transfusão)	Hb: < 7 g/dL Anisocitose (++++) Hipocromia (++++) Eritroblastos (++)	Hb A: ausente* Hb Fetal > 90% Hb A_2: 2%-6%

* Verificar se o sangue do paciente não está contaminado por transfusão de eritrócitos.

Fonte: Naoum PC; 1997.

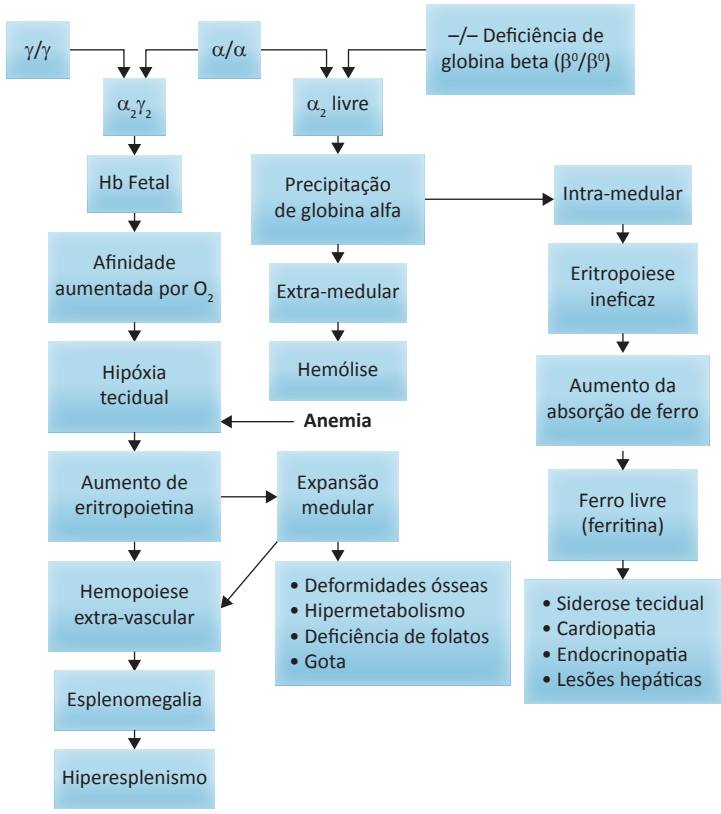


Figura 50.9 Esquema representativo dos principais efeitos fisiopatológicos e eritrocitopatológicos na talassemia β maior (β^0/β^0).

Fonte: Naoum PC; .2005.

- Resultante de todos esses processos deletérios, as alterações laboratoriais são muito evidentes, cuja sinopse pode ser analisada na Tabela 50.14.

DOENÇA FALCIFORME

Doença falciforme é um termo genérico usado para determinar os diferentes tipos das síndromes falcêmicas e que se caracterizam pelo predomínio da concentração de Hb S em comparação aos outros tipos de hemoglobinas com a qual está combinada. Assim, há vários tipos de doença falciforme, conforme mostra a Tabela 50.15.

Com referência específica à anemia falciforme, trata-se do estado de homozigose da Hb S, por isso representado quase invariavelmente por Hb SS, apesar de contar níveis de Hb Fetal com concentrações entre 2% e 10%. As pessoas que padecem desta doença revelam, quase invariavelmente, repetidos episódios dolorosos, geralmente do tipo vasculoclusivo, com ou sem efeitos mielodepressivos (deficiência temporária da medula óssea em produzir eritrócitos). Os sinais e sintomas são especialmente causados por anemia crônica, períodos de agravamento de anemia, dores nas juntas e nas extremidades de mãos e pés, dores abdominais, necrose asséptica da medula, acidentes cerebrovasculares, infartos pulmonares, dentre outros. A Tabela 50.16 resume, também, as alterações específicas da anemia falciforme.

Os recém-nascidos com anemia falciforme geralmente não apresentam os problemas relatados acima devido à alta concentração de Hb Fetal presente nos eritrócitos durante os dois primeiros meses de vida. A partir do terceiro mês de vida, quando os níveis de Hb Fetal caem para aproximadamente 2%, a doença começa a aparecer. A importância da Hb Fetal na anemia falciforme se deve ao fato de que sua interação com a Hb S, num mesmo eritrócito, impede que o processo de falcização deforme a célula até o estado de "falcização irreversível". Por essa razão, um dos principais controles que se faz na avaliação laboratorial de quem tem a anemia falciforme é o nível de Hb Fetal. Quando a Hb Fetal está acima de 5%, é comum que os episódios de crises dolorosas causadas pelas oclusões vasculares sejam menores.

Tabela 50.14 Sinopse das alterações laboratoriais em doentes com talassemia β maior (β^0/β^0, $^+/\beta^+$ ou β^0/β^+).

Talassemia β maior		
Características laboratoriais		
[ ] Hb Fetal – 20%-90%		
[ ] Anemia hemolítica e hipocrômica (Hb < 7 g/dL)		
[ ] Morfologia eritrocitária:	anisocitose	poiquilocitose
	células-alvo	esferócitos
	formas bizarras	macrócitos
	células fragmentadas	micrócitos
	siderócitos	hipocromia
	pontilhados basófilos	eritroblastos
		anel de Cabot
[ ] Reticulócitos: aumentados		
[ ] Leucócitos: frequentemente elevados com desvio à esquerda		
[ ] Plaquetas: normais		
[ ] Ferro sérico e capacidade de transporte: elevada		
[ ] Ferritina: elevada		
[ ] LDH sérico: elevado		
[ ] Bilirrubina indireta: elevada		
[ ] Urobilinogênio na urina: elevado		
[ ] Sobrevida dos eritrócitos: diminuída		
[ ] Fragilidade osmótica: diminuída		
[ ] Fragilidade mecânica: aumentada		
[ ] Medula óssea: hiperplasia das células eritroides		

Fonte: Naoum PC, Naoum FA; 2004.

Tabela 50.15 Diferenciação dos principais genótipos de Hb S relacionados aos valores de hemoglobina (Hb g/dL), volume corpuscular médio (VCM), reticulócitos e Hb Fetal.

Doença	Genótipo	Hb (g/dL)	VCM (fL)	Reticulócitos (%)	Hb Fetal (%)
Anemia falciforme	β^S/β^S $\alpha\alpha/\alpha\alpha$	5–9	85–110	10–20	2–10
Hb S/Tal. α *	β^S/β^S $\alpha\text{-}/\alpha\text{-}$	6–10	70– 0	5–10	2–20
Hb SC	β^S/β^C $\alpha\alpha/\alpha\alpha$	9–13	75–85	5–10	1–5
Hb S/Tal. β^0	β^S/β^0 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$	7–10	60–70	5–15	5–20
Hb S/tal β^+ **	β^S/β^+ $\alpha\alpha/\alpha\alpha$	9–11	60–70	5–10	5–10

* Deleção de dois genes α.

** Em eletroforese identificam-se as frações de Hb A, F e S; a Hb S tem concentração maior que a Hb A.

Fonte: Naoum PC, Naoum FA; 2004.

Tabela 50.16 Alterações laboratoriais específicas na anemia falciforme.

Exames laboratoriais	Valores esperados
Concentração da Hb S*	90%-98%
Dosagem de Hb fetal	2%-10%
Tipo de anemia	Normocítica e normocrômica
Dosagem de Hb	7 a 9 g/dL
Contagem de reticulócito	5%-30%
Leucócitos**	Acima de 10 mil
Plaquetas	Plaquetose, com anisocitose
Fragilidade osmótica	Diminuída
Bilirrubina indireta	Acima de 5 mg/dL
Urobilinogênio urinário	Elevado
Urobilinogênio fecal	Elevado
Hematúria	Frequente
Ácido úrico sérico	Frequentemente elevado
Ferro sérico	Normal ou aumentado
Ferritona	Frequentemente elevada
Fosfatase alcalina sérica	Elevada nas crises

* Avaliada por eletroforese ou cromatografia HPLC.

** Durante as crises dolorosas. Pode ter desvio à esquerda.

Fonte: Naoum PC, Naoum FA; 2004.

O traço falciforme (Hb AS) caracteriza o portador assintomático, laboratorialmente representado pela associação entre as hemoglobinas A e S, ou Hb AS. A concentração da Hb S no traço falciforme é sempre menor que a da Hb A e, por essa razão, o portador heterozigoto não tem anemia e não padece da doença.

A representação esquemática das posições eletroforéticas de genótipos AS, SS e SD, mostrada na Figura 50.4, auxilia a interpretação laboratorial de algumas situações da presença de Hb S.

Por fim, a importância que se dá à doença falciforme no Brasil se deve ao contingente populacional negro ser próximo de 40% da nossa população. Como se sabe, a origem da Hb S deve ter ocorrido entre 50 e 100 mil anos em pelo menos três regiões da África e em duas da Ásia. Com influxo de populações africanas escravizadas para o Brasil desde o ano de 1530 até por volta de 1830, o gene da Hb S espalhou-se por todo o país. Por essa razão a prevalência do traço falciforme em nosso país é variável entre 2% e 8%, conforme a região, e uma pessoa em cada 15 mil é portadora da doença falciforme.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Bain BJ, Gupta R. A – Z of Haematology. London: Blackwell Publi., 2003.
2. Bunn HF, Aster JC. Phatophisiology of blood disease. Boston: Ed. Mac Graw Hil, 2001.
3. Dacie JV, Lewis SM. Practical Haematology. 8.ed. Edinburgh: Churchill Levingstone, 1995.
4. Hillman RS, Finch CA. Red cell manual. 7.ed. Philadelphia: F.A. Davis Co, 1996.
5. Hoffbrand AV, Lewis SM, Tuddenham EGD. Postgraduate Haematology. 6.ed. Oxford, 2008.

6. Hoffbrand AV, Petit JE, Moss PAH. Haematology Essential. Oxford: Blackwell Science, 2001.
7. Howard MR, Hamilton PJ. Haematology. London: Churchill Levingstone, 1997.
8. Hughes-Jones NC, Wickramasinghe SN. Lecture notes on Haematology. 5.ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1993.
9. Kanp G. Cell and molecular biology. 2.ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 1999.
10. Lorenzi T. Manual de Hematologia. Propedêutica e clínica. 3.ed. Rio de Janeiro: Ed. Medsi, 2003.
11. Naoum PC. Hemoglobinopatias e Talassemias. São Paulo: Ed. Sarvier, 1997.
12. Naoum PC. CD-Rom "Doenças dos eritrócitos". São José do Rio Preto: Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, 2005.
13. Naoum PC, Naoum FA. Doença das células falciformes. São Paulo: Ed. Sarvier, 2004
14. Naoum FA. Doenças que alteram os exames hematológicos. São Paulo: Ed. Atheneu, 2010.
15. Oliveira AGR, Poli Neto A. Anemias e Leucemias. São Paulo: Ed. Rocca, 2004.
16. Provan D, Henson A. ABC of Clinical Hematology. London: BMJ Publ Group, 1998.
17. Provan D, Griubbean J. Molecular Haematology. Oxford: Blackwell Science, 2000.
18. Rodgers GP. Sickle cell disease and thalassaemia. London: Ed. Ballière Tindall, 1998.
19. Rowan RM, Assendeler Ow, Preston FE. Advanced Laboratory methods in haematology. London: Arnold Ed., 2002.
20. Stiene-Martin EA, Steininger CAL, Koepke JA. Clinical Hematology. 2.ed. Philadelphia, 1998.
21. Travers P, Hane Way Jr CA. Imunobiologia. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1997.
22. Wintrobe MM, Lee GR, Boggs DR, et al. Clinical Hematology. 12.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1996.

51

capítulo

Flávio Naoum

Diagnóstico Laboratorial das Neoplasias Hematológicas

INTRODUÇÃO ÀS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

De forma geral, e obedecendo à classificação atual, podemos dispor as doenças onco-hematológicas em quatro grupos: leucemia mieloide aguda, neoplasias mieloproliferativas, doenças linfoproliferativas e síndromes mielodisplásicas.

- **Leucemia mieloide aguda (LMA):** doença agressiva com vários subtipos, que são diferenciados pela análise morfológica, citogenética e imunofenotípica.
- **Neoplasias mieloproliferativas (NMP):** apresentam, em comum, evolução mais indolente, presença de panmielose (hiperplasia nos três setores da medula óssea – série vermelha, série granulocítica e série megacariocítica) e acometimento de pacientes com faixa etária mais avançada. As principais doenças que integram esse grupo são a leucemia mieloide crônica, policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária e leucemia mielomonocítica crônica, essa última classificada de forma "híbrida" com as síndromes mielodisplásicas.
- **Doenças linfoproliferativas:** abrangem as leucemias linfoides agudas e crônicas, além dos linfomas. Pela classificação da Organização Mundial da Saúde (2001), as doenças linfoproliferativas são subdivididas por imunofenótipo em neoplasias de células B e neoplasias de células T, sendo que cada um desses subgrupos contém um grande número de doenças diferentes.
- **Síndromes mielodisplásicas (SMD):** compreendem um grupo de doenças clonais que acometem principalmente pacientes idosos. Em geral, manifesta-se por citopenia periférica associada à hiperplasia medular com displasia de uma ou mais séries, além da tendência de evolução para LMA.

As neoplasias hematológicas podem resultar de mutações únicas ou múltiplas em células-tronco, como no caso das leucemias agudas, SMD e NMP, ou em células mais amadurecidas, como no caso de alguns linfomas. Tais mutações resultam na hiperexpressão de um oncogene ou na inibição de um gene supressor do câncer, causando a proliferação desenfreada ou inibindo a apoptose da célula afetada, resultando na formação de um clone de células neoplásicas.

RECURSOS DIAGNÓSTICOS

O quadro clínico das doenças hematológicas é muito variável, com pacientes assintomáticos nos casos de neoplasias com comportamento indolente até aqueles com sérias complicações clínicas, como anemias de acentuada intensidade, sangramentos profusos, choque séptico, síndromes de compressão tumoral, entre outras observadas nos casos de neoplasias com comportamento agressivo. Assim, o caráter variável e frequentemente inespecífico dos sinais e sintomas apresentados justifica a evidente dependência dos hematologistas em relação aos exames laboratoriais, e por vezes histológicos, para a devida confirmação diagnóstica. Além disso, os recursos laboratoriais, notadamente os mais avançados, têm sido cada vez mais utilizados não apenas para fins diagnósticos, mas também como importantes marcadores prognósticos que auxiliam na decisão do tratamento.

Além do hemograma, dois procedimentos diagnósticos são extremamente importantes na investigação das doenças onco-hematológicas: o mielograma e a biópsia de medula óssea, sendo ambos os procedimentos ambulatoriais e de competência do hematologista clínico. No entanto, frequentemente o diagnóstico diferencial entre as neoplasias hematológicas requer também a utilização de recursos adicionais como citoquímica, imunofenotipagem, citogenética e métodos que utilizam a biologia molecular, os quais aliados à análise morfológica (citológica ou histológica) e ao quadro clínico do paciente possibilitam o diagnóstico e classificação correta dessas doenças.

- **Hemograma:** o hemograma é fundamental nesse contexto, pois é por meio dele que se faz a suspeita

inicial da maioria das neoplasias hematológicas, especialmente as leucemias, NMP e SMD. A interpretação cuidadosa e a análise citológica minuciosa do esfregaço do sangue periférico por um examinador experiente, embora não permitam a conclusão do diagnóstico, geralmente fortalecem uma suspeita específica, sinalizando com maior clareza os próximos testes necessários para a confirmação de um determinado tipo de doença.

- **Mielograma:** é uma punção medular realizada sob anestesia local, que no adulto pode ser feita tanto no esterno quanto na crista ilíaca posterior (Figura 51.1). O mielograma permite uma análise detalhada da morfologia das células da medula óssea e uma contagem diferencial mais acurada. O mielograma fornece uma estimativa aproximada da celularidade medular e da infiltração de medula óssea por neoplasias provenientes de outros locais (mieloftise). É frequentemente utilizado para diagnóstico e acompanhamento das leucemias.

Figura 51.1 Coleta de mielograma realizada pelo autor no esterno do paciente e sob anestesia local.
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

- **Biópsia de medula óssea (BMO):** é a retirada de um fragmento de medula óssea da crista ilíaca realizada sob anestesia local. Esse procedimento permite a análise histológica detalhada da celularidade e da arquitetura medular (disposição de células, trabéculas ósseas e presença de fibrose na medula óssea); por essas razões é considerado um bom método para detectar infiltração da medula óssea por células metastáticas (mieloftise). Fornece uma estimativa pouco sensível da morfologia celular, motivo pelo qual se costuma realizar um "*imprint*" do material em lâmina (Figura 51.2). A BMO é frequentemente realizada para estagiamento de linfomas, suspeita de mieloftise, pesquisa de fibrose medular e estudo de medula óssea quando o material do aspirado medular (mielograma) é escasso.

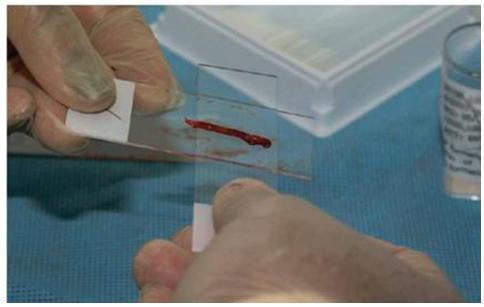


Figura 51.2 Realização de "*imprint*" em lâmina a partir de fragmento obtido por biópsia de medula óssea.
Fonte: Roger S, *et al*. An illustrated guide to performing the bone marrow aspiration and biopsy. Medical College of Virginia. http://www.coimbatorehaematology.com/pdf/Bone%20marrow%20aspiration%20technique.pdf

- **Citoquímica:** é um recurso diagnóstico prático e útil na diferenciação da linhagem de células neoplásicas, notadamente de blastos indiferenciados (Figura 51.3). A citoquímica pode ser utilizada de forma complementar à morfologia nos aspirados e biópsias de medula óssea. Recentemente, nota-se tendência de desuso dessa técnica nos aspirados medulares por conta da maior disponibilidade da imunofenotipagem por citometria de fluxo.

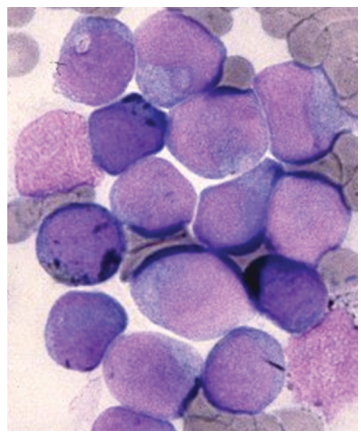


Figura 51.3 Análise citoquímica em lâmina de medula óssea. Observar positividade citoplasmática para o corante Sudan Black em vários mieloblastos.
Fonte: Adaptada do livro Doenças que Alteram os Exames Hematológicos – Naoum FA.

- **Imunofenotipagem:** a análise das células do sangue periférico ou da medula óssea por citometria de fluxo é um excelente recurso diagnóstico para determinar a linhagem e o grau de maturação das células neoplásicas, auxiliando no diagnóstico e na classificação a partir da determinação do subtipo da neoplasia hematológica em questão. Vale ressaltar que essa técnica permite não só detectar a presença de vários marcadores específicos na membrana, citoplasma ou núcleo das células neoplásicas, como também a quantificação da expressão desses marcadores em cada célula (Figura 51.4).

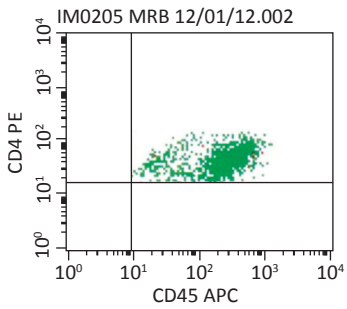


Figura 51.4 Identificação de linfócitos T CD4+ e CD45+ por citometria de fluxo.
Fonte: Academia de Ciência e Tecnologia.

- **Citogenética:** essa técnica permite a análise da estrutura dos cromossomos. As duas técnicas mais utilizadas são o cariótipo por bandas e o FISH (hibridização *in situ* por fluorescência). No cariótipo, as células são analisadas na fase de metáfase – preferencialmente pelo menos 20 células devem estar em condições de análise – e os seus cromossomos são ordenados e pareados para identificação de possíveis alterações numéricas e estruturais (Figura 51.5). No FISH são utilizadas sondas conjugadas a fluorocromos contendo DNA complementar à região que se deseja estudar, e as células podem ser analisadas em interfase, o que permite a análise de um grande número de células.

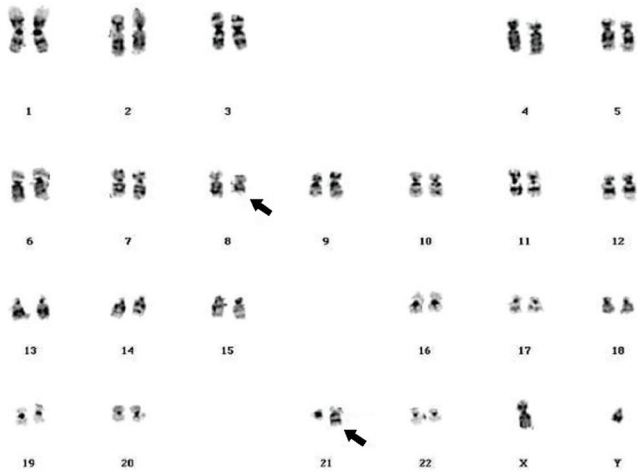


Figura 51.5 Cariótipo por bandeamento de células de medula óssea de paciente portador de leucemia mieloide aguda (subtipo M2), evidenciando translocação entre os cromossomos 8 e 21 (setas).
Fonte: Academia de Ciência e Tecnologia.

- **Biologia molecular:** muitas das mutações no DNA que causam neoplasias hematológicas são passíveis de amplificação pela técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR). Embora seu uso não seja rotineiro na investigação de neoplasias hematológicas em comparação com as outras técnicas descritas, é cada vez mais frequente a incorporação formal desses testes no monitoramento ou na confirmação diagnóstica das neoplasias hematológicas, como é o caso do gene da fusão BCR-ABL na leucemia mieloide crônica e da mutação do gene *JAK2 V617* nas neoplasias mieloproliferativas.

A Figura 51.6 demonstra o nível de detecção de células neoplásicas, no caso, leucêmicas, pelas técnicas laboratoriais mais utilizadas neste contexto. Observa-se que técnicas como a citogenética, e notadamente a biologia molecular, são capazes de detectar a presença de células leucêmicas, mesmo em pequena quantidade. Este fato revela a utilidade desses recursos não apenas do ponto de vista diagnóstico, mas também com relação ao monitoramento de doença residual após o tratamento.

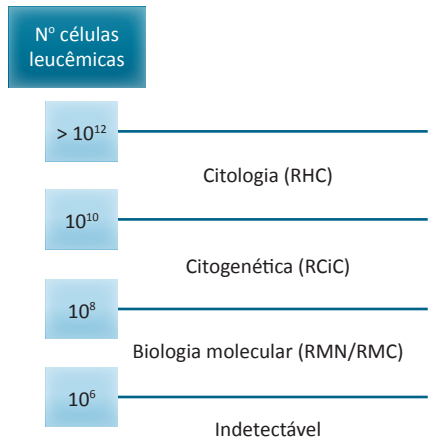


Figura 51.6 Detecção do volume de células leucêmicas em função do tipo de técnica utilizada no monitoramento de doença residual mínima. (RHC – remissão hematológica completa; RCiC – remissão citogenética completa; RMM/RMC – remissão molecular maior/completa).
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

Vale destacar que mesmo com todos esses recursos diagnósticos disponíveis na atualidade, a interpretação do hemograma e a análise citológica do esfregaço de sangue periférico continuam sendo fundamentais e indispensáveis no diagnóstico das neoplasias hematológicas, especialmente das leucemias. Essa afirmação pode ser justificada pelas seguintes situações:

- Frequentemente, o laboratorista é o primeiro a entrar em contato com uma doença onco-hematológica (p. ex.: leucemia linfoide crônica) a partir da análise de um hemograma alterado, o qual não raramente é realizado por outro motivo (p. ex.: pré-operatório, "*check-up*" etc.). É nesse momento que contam a competência e a experiência do profissional, no sentido de levantar a suspeita diagnóstica e tomar as atitudes cabíveis para que o paciente seja referenciado para ter seu diagnóstico confirmado o mais precocemente possível.

- A partir da suspeita diagnóstica oferecida por um hemograma alterado é deflagrado todo o processo detalhado de investigação diagnóstica muitas vezes protocolar – e o direcionamento terapêutico em função do diagnóstico estabelecido.

Entretanto, é importante ressaltar que, embora a análise do hemograma seja de especial importância para gerar a suspeita de uma determinada doença, a expectativa de se estabelecer um diagnóstico definitivo apenas com esse exame pode ser uma atitude precipitada e imprudente.

Por se tratar de tema extremamente amplo, será dado maior ênfase nas seções seguintes aos principais grupos de doenças onco-hematológicas que provocam alterações leucocitárias com repercussão laboratorial.

LEUCEMIAS

As leucemias estão entre os dez tipos de câncer mais comuns na população brasileira. A cada ano, no Brasil, são contabilizados cerca de 9 mil casos novos de leucemia, e aproximadamente 6 mil mortes pela doença.

As leucemias são habitualmente classificadas em agudas e crônicas em função do tempo de evolução, e em mieloides ou linfoides dependendo da sua linhagem de origem. Resultam, portanto, dessa combinação, os principais tipos de leucemia que serão discutidos neste capítulo: leucemia mieloide aguda, leucemia linfoide aguda, leucemia mieloide crônica e leucemia linfoide crônica. É importante destacar que o termo mieloide nas leucemias significa que o processo neoplásico pode envolver granulócitos, monócitos, eritrócitos e megacariócitos. Há ainda outros tipos de leucemia menos frequentes, como são os casos das leucemias eosinofílicas e basofílicas, além daquelas derivadas da infiltração da medula óssea por linfoma com consequente invasão do sangue periférico por células linfoides neoplásicas (linfomas "leucemizados").

As leucemias agudas são mais agressivas, com tempo de instalação curto (dias a semanas), e se caracterizam pelo predomínio de blastos no sangue periférico e na medula óssea, pois, apesar da alta taxa de proliferação celular, a célula leucêmica perde a capacidade de diferenciação. Já nas leucemias crônicas, a instalação é mais insidiosa (meses a anos) e as células leucêmicas preservam em meio à hiperproliferação certa capacidade de diferenciação celular, que geralmente é apenas morfológica e não funcional.

Em geral, o hemograma nas leucemias agudas revela leucocitose acentuada com franco predomínio de blastos, associados à presença de anemia normocítica e normocrômica e plaquetopenia significativa. Nas leucemias crônicas, há leucocitose com grande número de células aparentemente diferenciadas, e a anemia e a plaquetopenia, quando presentes, tendem a ser de intensidade menor.

Leucemia mieloide aguda

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma neoplasia clonal, heterogênea e progressiva do tecido hematopoiético, causada por uma alteração da célula-tronco hematopoiética, que provoca proliferação celular descontrolada associada à perda da capacidade de diferenciação. Consequentemente, há aumento de mieloblastos na medula óssea, que se mantêm indiferenciados ou parcialmente diferenciados, podendo envolver ou não a circulação periférica. Com a intensa proliferação das células leucêmicas na medula óssea, o tecido hematopoiético normal remanescente passa a ser substituído gradativamente pelo clone leucêmico. Quando não tratada, a LMA é rapidamente fatal e a morte geralmente é uma consequência da pancitopenia resultante da substituição da medula óssea por mieloblastos.

A LMA é tipicamente uma doença de indivíduos adultos, respondendo por cerca de 80% das leucemias agudas nessa faixa etária, com pico de incidência por volta dos 64 anos de idade. Na infância, a LMA representa apenas 20% das leucemias agudas.

As manifestações clínicas dessa doença geralmente são de instalação aguda e decorrem da insuficiência da medula óssea em razão de sua infiltração por células leucêmicas, destacando-se o cansaço (anemia), o risco de infecções graves (neutropenia) e de sangramentos (plaquetopenia).

A primeira classificação mundialmente reconhecida – e utilizada até hoje – para as leucemias agudas foi elaborada há quase quatro décadas por pesquisadores franceses, americanos e britânicos (grupo FAB), e baseia-se exclusivamente em critérios morfológicos e citoquímicos. A Tabela 51.1 mostra a classificação FAB para leucemia mieloide aguda, com oito subtipos determinados pelo elevado número de blastos e pela linhagem acometida pela leucemia, bem como seu grau de maturação, valendo-se principalmente da citologia da medula óssea.

Tabela 51.1 Classificação morfológica do grupo FAB para leucemia mieloide aguda e painel citoquímico.

Subtipo FAB	MPO	SB	EN
M0: LMA com diferenciação mínima	–	–	–
M1: LMA sem maturação	+	+	–
M2: LMA com maturação	+	+	–
M3: leucemia promielocítica aguda	+	+	–
M4: leucemia mielomonocítica aguda	+	+	+
M5: leucemia monocítica aguda	–	–	+
M6: eritroleucemia	+	+	-
M7: leucemia megacariocítica aguda	–	–	+

MPO – mieloperoxidase, SB – *sudan black*, EN – esterase não específica.
Fonte: Bennett JM, *et al.* Br J Haematol, 1976;33:451-8.

Recentemente, a OMS refez a classificação das LMAs incorporando, além da morfologia, características com relevância clínica e biológica comprovadas como, por exemplo, alterações genéticas e imunofenotípicas (Tabela 51.2). Essa nova classificação está em concordância com a tendência atual de se reconhecer os tipos de leucemia como entidades distintas quanto à fisiopatologia, aspectos laboratoriais e clínicos, e tratamento. O grupo da OMS também determinou o limite inferior do número de mieloblastos necessários para o diagnóstico. Assim, pela nova classificação, a presença de pelo menos 20% de *mieloblastos* estabelece o diagnóstico de LMA. Para efeito de preenchimento desse critério numérico, deve-se contar como blastos os mieloblastos, os monoblastos, os promonócitos e os megacarioblastos; os promielócitos anômalos equivalem a blastos na leucemia promielocítica aguda (Figura 51.7).

Tabela 51.2 Classificação das leucemias mieloides agudas pela OMS.

LMA com anormalidades citogenéticas recorrentes • t(8;21) (AML1-ETO) • inv(16) (CBFB-MYH11) • Leucemia promielocítica aguda - t(15;17) (PML-RARA) • LMA com anormalidades 11q23 (gene MLL)
LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia
LMA relacionadas com terapia
LMA não classificada em outros grupos
LMA com linhagem ambígua

Fonte: Vardiman JW, *et al*. Blood. 2009;114:937-51.

O hemograma dos pacientes com LMA geralmente apresenta leucocitose acentuada à custa de mieloblastos que, exceto na fase inicial da doença, correspondem à maior fração da contagem diferencial do leucograma. Como a produção das outras séries é também afetada, observa-se com frequência plaquetopenia e anemia normocítica e normocrômica de moderada a acentuada intensidade. Nos casos de leucocitose acentuada (> 50.000/mm^3) com predomínio de mieloblastos, a suspeita diagnóstica é mais evidente a partir do sangue periférico (Quadro 51.1); em contrapartida, uma leucometria diminuída com poucos mieloblastos circulantes pode dificultar o diagnóstico.

Quadro 51.1 Exemplo de hemograma de paciente portador de LMA ao diagnóstico.

Hemoglobina	**7,1 g/dL**
Leucócitos totais	98.000/mm^3
Mieloblastos	87%
Bastonetes	02%
Segmentados	07%
Eosinófilos	01%
Linfócitos	03%
Plaquetas	**34.000/mm^3**

Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

Quanto à análise citológica, os mieloblastos são células de tamanho aumentado com núcleo exibindo cromatina frouxa com a presença de um ou mais nucléolos, além de citoplasma basofílico, podendo apresentar alterações características, como granulação (mieloblasto granular) e bastonetes de Auer. A ausência de granulação citoplasmática (mieloblasto agranular) pode tornar difícil ou mesmo impossível a sua distinção do linfoblasto (Tabela 51.3).

Há sempre a necessidade de se realizar um mielograma para confirmar o diagnóstico de LMA e classificar a doença com relação à morfologia, que pode ainda ser complementada pela análise citoquímica (ver Tabela 51.1). A partir do

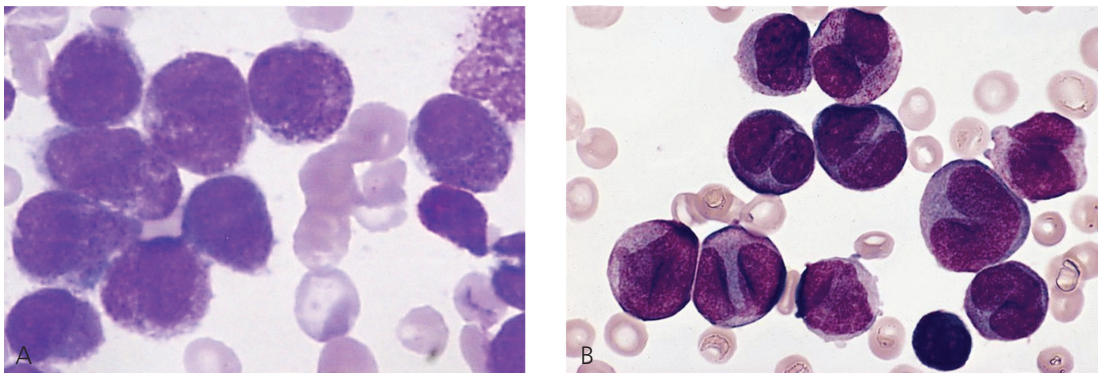
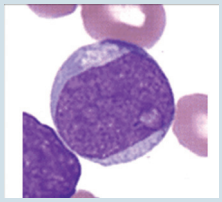
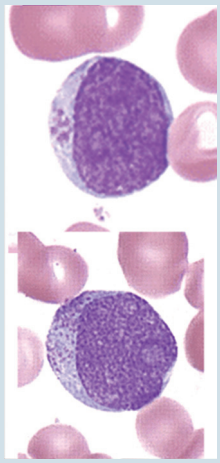
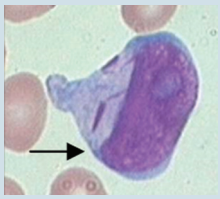


Figura 51.7 Promielócitos anômalos na leucemia promielocítica aguda **(A)** e na sua variante hipogranular **(B)**.
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

Tabela 51.3 Apresentação morfológica dos mieloblastos.

	Mieloblasto agranular
	Mieloblastos granulares
	Mieloblasto com bastonete de Auer (seta)

Fonte: Adaptada do livro Doenças que Alteram os Exames Hematológicos – Naoum FA.

aspirado medular, é imprescindível a realização de dois testes: a imunofenotipagem e a citogenética. A imunofenotipagem revela positividade dos blastos mieloides para os marcadores CD13 e CD33, sendo também extremamente útil na confirmação da linhagem envolvida na LMA, além de permitir o monitoramento de doença residual mínima por meio de marcadores aberrantes. A citogenética, por sua vez, apresenta forte valor prognóstico dependendo das alterações cromossômicas reveladas, o que pode interferir substancialmente no planejamento terapêutico. Na Tabela 51.2 estão listadas as alterações cromossômicas que conferem bom prognóstico ao paciente. Vale ressaltar que, no caso de citogenética normal, recomenda-se, se possível, a pesquisa por biologia molecular das mutações nos genes *NPM1*, *CBPA* e *FLT3*.

A biópsia de medula óssea não é um procedimento realizado rotineiramente para o diagnóstico das leucemias agudas. Entretanto, quando a punção medular (mielograma) é difícil e o material é escasso ("punção seca"), a BMO é importante para concluir se a aspiração difícil resulta de medula hipocelular ou medula óssea densamente infiltrada. O diagnóstico de LMA-M7 (leucemia megacarioblástica) frequentemente é feito por BMO, uma vez que essa doença cursa com fibrose medular, que resulta em "punção seca" no mielograma.

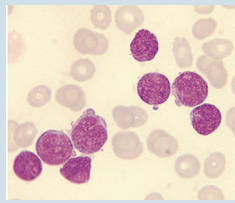
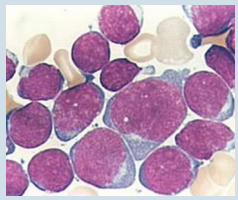
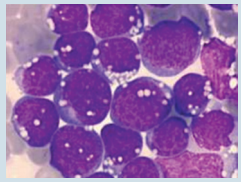
Leucemia linfoide aguda

A leucemia linfoide aguda (LLA) é uma neoplasia linfoide agressiva e clonal, manifestada pela proliferação de linfoblastos na medula óssea. Os linfoblastos derivam de células linfoides B ou T imaturas. A LLA responde por 80% das leucemias agudas que ocorrem na infância, sendo seu pico de incidência por volta dos 2 aos 5 anos de idade. No adulto, a LLA corresponde a 20% das leucemias agudas dessa faixa etária e é geralmente mais agressiva do que na criança.

O quadro clínico na LLA se caracteriza por anemia, sangramentos, febre e infecções por conta da substituição dos elementos normais da hematopoiese pelas células leucêmicas. Algumas particularidades clínicas da LLA são a dor óssea e o fato de se tratar da leucemia que mais infiltra o sistema nervoso central, daí a necessidade de coleta e análise do liquor em todos os casos diagnosticados.

A LLA também foi classificada com relação à morfologia pelo grupo FAB, que se baseou nas características citológicas dos linfoblastos conforme mostra a Tabela 51.4.

Tabela 51.4 Classificação FAB da leucemia linfoide aguda.

	**LLA-L1** Linfoblastos pequenos e monomórficos com alta relação núcleo-citoplasmática. Núcleo de limites regulares, com cromatina frouxa e nucléolos geralmente ausentes. Citoplasma escasso com basofilia discreta ou moderada.
	**LLA-L2** Linfoblastos grandes e heterogêneos com baixa relação núcleo-citoplasmática. Núcleo de tamanho e forma variável, com cromatina frouxa e nucléolos visíveis. Citoplasma geralmente abundante, com basofilia variável.
	**LLA-L3 (tipo Burkitt)** Linfoblastos grandes e homogêneos. Apresenta núcleos arredondados, com cromatina frouxa e presença de nucléolos. Citoplasma moderadamente abundante, com intensa basofilia e vacuolização citoplasmática.

Fonte: Adaptada do livro Doenças que Alteram os Exames Hematológicos – Naoum FA.

Assim como na LMA, a classificação da LLA baseada estritamente em critérios morfológicos também apresenta limitações, especialmente para os subtipos L1 e L2 que, embora morfologicamente distintos, não apresentam claras diferenças em termos de evolução e resposta ao tratamento.

Atualmente é imprescindível realizar a análise imunofenotípica da LLA, com determinação da linhagem (B ou T) e estágio de maturação dos linfoblastos. Cerca de 80% das LLA apresentam imunofenótipo de linhagem B.

A citogenética guarda forte relação com o prognóstico dos pacientes com LLA, com destaque para a presença do cromossomo Philadelphia, associado a um mau prognóstico, e da hiperdiploidia, associada a um bom prognóstico nessa doença.

Em relação ao hemograma na LLA, cerca de 60% dos pacientes apresentam leucometria superior a 10.000/mm^3. Entretanto, 25% dos pacientes com LLA são leucopênicos (leucócitos < 4.000/mm^3). Nos casos de leucocitose, os linfoblastos são as células predominantes e são observadas também sombras nucleares (células linfoides frágeis, destruídas na realização do esfregaço). Em contrapartida, os indivíduos leucopênicos podem apresentar linfoblastos em pequeno número ou ausentes, situação denominada por alguns autores leucemia "aleucêmica".

Em quase todos os pacientes com LLA, as descrições do mielograma incluem medula óssea hipercelular com intensa infiltração por linfoblastos. Por esse motivo, anemia e plaquetopenia no hemograma estão constantemente presentes ao diagnóstico. Pode haver fibrose medular em 10% a 15% dos casos.

O diagnóstico diferencial de LLA inclui linfocitose atípica decorrente de infecções virais, tumores sólidos com metástase para medula óssea e leucemia mieloide aguda.

No caso das infecções virais, o quadro clínico é típico, com febre, linfonodomegalia superficial e, às vezes, esplenomegalia; o curso é autolimitado e a leucometria, bem como o número de linfócitos atípicos, diminui com a resolução da doença. Certos linfócitos atípicos cujo núcleo apresenta cromatina pouco condensada e nucléolo são identificados apenas pelo fato de serem mais pleomórficos que os linfoblastos. Em boa parte dos casos, um citologista experiente consegue diferenciar sem dificuldades ambas as situações.

Contudo, em alguns casos, a diferenciação entre linfoblastos e mieloblastos pode ser difícil ou mesmo impossível apenas por critérios morfológicos, por exemplo, na diferenciação entre linfoblastos característicos de LLA-L2 e mieloblastos agranulares da LMA-M0 ou M1. Nessas situações, são necessários recursos adicionais como:

- **citoquímica:** linfoblastos são geralmente positivos para PAS. Fosfatase ácida é positiva principalmente nas células de linhagem T;
- **imunofenotipagem:** recurso capaz de confirmar a linhagem do linfoblasto (B ou T) e determinar seu estágio de maturação;
- **citogenética:** na LLA, assim como na LMA, a determinação do cariótipo é mais importante para a avaliação do prognóstico do que para diagnóstico diferencial. As principais alterações citogenéticas associadas a imunofenótipos específicos da LLA são: t(1;19) na LLA pré-B; t(8;14) na LLA-B (tipo Burkitt); t(4;11) na LLA mista com marcadores mieloides; t(9;22) ou cromossomo Ph+ na LLA pró-B.

Leucemia linfoide crônica

A LLC é uma doença de progressão lenta e curso indolente, caracterizada pela proliferação e acúmulo de linfócitos B inicialmente nos linfonodos e na medula óssea, expandindo daí para o sangue periférico e demais órgãos hematopoiéticos. Nos estágios avançados há disfunção do sistema imune e, por vezes, manifestações de autoimunidade.

A leucemia linfoide crônica (LLC) corresponde a aproximadamente 25% de todas as leucemias e a 60% das doenças linfoproliferativas. Acomete principalmente pacientes idosos entre 60 e 80 anos de idade; apenas 10% dos pacientes têm menos de 50 anos. A incidência é duas vezes maior no sexo masculino. Entre todas as leucemias, a LLC é a que tem a maior frequencia familiar, em que 10% dos casos apresentam parente de primeiro grau com a doença.

No quadro clínico associado à LLC, destacam-se a fadiga, as adenomegalias, muitas vezes difusas e indolores, além de hepatoesplenomegalia. No entanto, a maioria dos pacientes é assintomática ao diagnóstico, e a suspeita ocorre por meio do hemograma realizado como parte de exames de rotina, pré-operatórios, ocupacionais, entre outros. Esse contexto reflete a responsabilidade da participação do laboratorista na suspeita diagnóstica, uma vez que, nessa situação, será o primeiro profissional a entrar em contato com a doença.

O hemograma de pacientes com LLC revela leucocitose variável (geralmente de 10.000 a 150.000/mm^3) com predomínio de linfócitos com morfologia aparentemente normal e semelhante à dos linfócitos "típicos", ou seja, linfócitos pequenos com citoplasma escasso e cromatina condensada (Figura 51.8). É comum a presença de sombras nucleares ou manchas de Gum-

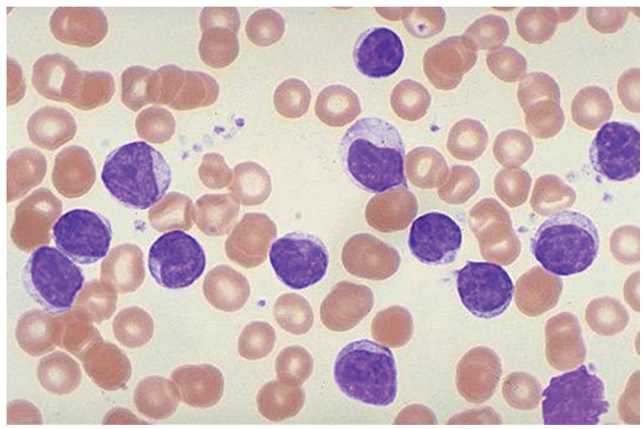


Figura 51.8 Linfocitose acentuada com predomínio de linfócitos de pequeno tamanho e de morfologia aparentemente madura em esfregaço sanguíneo de paciente com LLC.
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

precht (linfócitos frágeis, destruídos na realização do esfregaço sanguíneo) que se correlacionam com o número de leucócitos totais e têm valor diagnóstico (Figura 51.9). Uma pequena proporção de prolinfócitos (1% a 5%) também é frequentemente observada no esfregaço sanguíneo de pacientes com LLC.

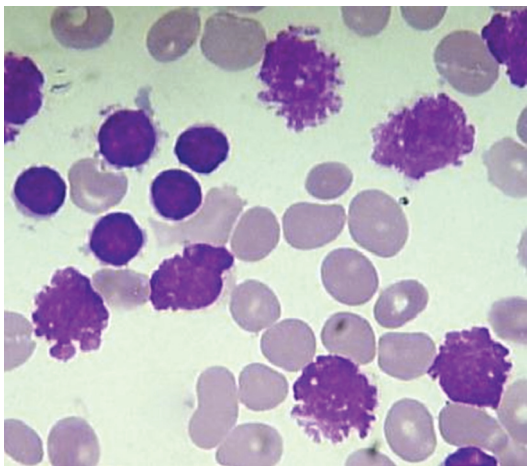


Figura 51.9 Manchas de Gumprecht (ou sombras nucleares) no sangue periférico de paciente com LLC.
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

Devido à linfocitose acentuada, perfazendo frequentemente 80% a 90% do diferencial de leucócitos, há diminuição do valor relativo (%) dos neutrófilos, porém a contagem absoluta geralmente se encontra dentro da normalidade (Quadro 51.2).

Quadro 51.2 Exemplo de hemograma de paciente portador de LLC.

Hemoglobina (g/dL)	12,5
Leucócitos (/mm³)	72.000
Linfócitos	89%
Neutrófilos	8%
Monócitos	2%
Eosinófilos	1%
Plaquetas (/mm³)	178.000

Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

A ocorrência de anemia ou plaquetopenia de acentuada intensidade é incomum na LLC, de forma que a presença dessas alterações nessa intensidade demanda a investigação de possível distúrbio autoimune associado, por exemplo, à anemia hemolítica autoimune, que ocorre em cerca de 10% dos casos.

O diagnóstico da LLC até o advento da imunofenotipagem era baseado principalmente em parâmetros quantitativos. Assim, o diagnóstico de LLC se estabelecia quando o paciente apresentava contagem absoluta e persistente de linfócitos superior a 10.000/mm³. Atualmente, uma contagem de pelo menos 5.000 linfócitos/mm³ com imunofenótipo característico de LLC, notadamente a positividade para os marcadores CD5 e CD23, confirma o diagnóstico. A utilização da imunofenotipagem para diagnóstico de LLC é fundamental para diferenciá-la de outras doenças neoplásicas que também cursam com linfocitose, como certos linfomas que infiltram medula óssea e sangue periférico. Além disso, a imunofenotipagem também pode ter implicação prognóstica na LLC, como no caso de positividade para CD38, que confere um mau prognóstico.

A realização do mielograma e da biópsia de medula óssea não são tão importantes para a confirmação diagnóstica tal qual o são com os outros tipos de leucemia. O infiltrado medular da LLC, tanto no aspirado quanto na biópsia de medula óssea, é caracterizado pela sua aparência "monótona" resultante da presença de grande quantidade de linfócitos pequenos e aparentemente normais, com pouca variabilidade morfológica. Essa infiltração se dá lentamente com a progressão da doença, e a análise do mielograma geralmente revela elevação do número de linfócitos na medula óssea (> 30%). É importante destacar que o padrão de infiltração pela LLC observado através da biópsia de medula óssea tem maior utilidade em virtude da sua relevância prognóstica. Assim, no início da doença o padrão de infiltração é nodular, ao passo que com a progressão do processo patológico torna-se difuso e associado a um prognóstico ruim.

O estudo citogenético da LLC revela alterações cromossômicas em cerca de 50% dos pacientes, sendo que as três principais alterações citogenéticas são: a trissomia do cromossomo 12, as deleções ou translocações do braço longo do cromossomo 13 e as deleções da região 11q23. Análises moleculares revelaram que mutações nos genes da região variável da imunoglobulina (IgV) conferem melhor prognóstico aos portadores de LLC.

Com relação à evolução, a LLC pode manter seu curso indolente ou sofrer transformação para um quadro semelhante ao da leucemia prolinfocítica (transformação prolinfocítica; Figura 51.10), que é mais comum, ou para um linfoma

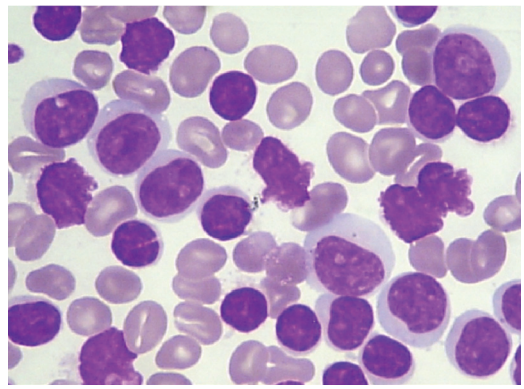


Figura 51.10 Aumento de prolinfócitos (células linfoides grandes, com citoplasma abundante e nucléolos evidentes) na transformação prolinfocítica da LLC.
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

agressivo de grandes células (síndrome de Richter), ambas as doenças de maior gravidade e prognóstico reservado.

Leucemia mieloide crônica

A LMC corresponde a 15% das leucemias do adulto, com pico de incidência entre os 40 e 50 anos de idade. Fatos importantes que marcaram o estudo da LMC foram a descoberta do cromossomo Philadelphia (Ph) em 1960 e a identificação do gene quimérico BCR-ABL em 1986.

Devido à evolução insidiosa da LMC, o diagnóstico é acidental em boa parte dos casos e os sinais e sintomas, quando presentes, consistem basicamente de fadiga, emagrecimento e esplenomegalia. Nos raros casos de leucocitose extrema (> 200.000 leucócitos/mm^3) pode haver sinais de hiperviscosidade sanguínea como tontura, cefaleia, turvação visual e parestesias.

A principal alteração do hemograma na LMC é a leucocitose, que geralmente varia de 50.000 a 200.000/mm^3, podendo atingir valores superiores a 600.000/mm^3. A leucocitose está geralmente acompanhada de predomínio de granulócitos, com desvio à esquerda, passando por todas as formas precursoras granulocíticas até mieloblastos (Figura 51.11). Frequentemente o desvio à esquerda presente na LMC não é escalonado, ou seja, não obedece a ordem natural de maturação das formas precursoras dos granulócitos. Porém, a presença de desvio escalonado não exclui de forma alguma a suspeita diagnóstica dessa doença. A citologia do esfregaço sanguíneo é fundamental e revela sinais de displasia variável na série granulocítica em boa parte dos casos de LMC. É comum a presença de eosinofilia e basofilia que, quando intensas, são indicativas de progressão da doença (Quadro 51.3). Os pacientes podem ainda apresentar anemia de intensidade leve a moderada, geralmente do tipo normocítica e normocrômica. É frequente também a presença de plaquetose com valores próximos de 600.000/mm^3, com plaquetas exibindo alterações morfológicas; no entanto, a plaquetometria pode estar normal ou até diminuída em alguns casos.

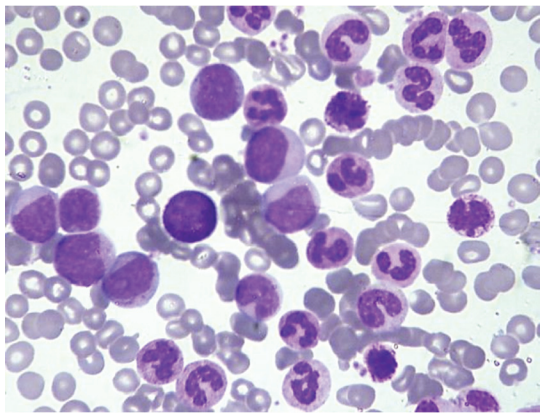


Figura 51.11 Presença de grande número de granulócitos em vários estágios de maturação no esfregaço de sangue periférico da LMC.
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

Quadro 51.3 Hemograma de portador de LMC, revelando leucocitose acentuada com desvio à esquerda não escalonado até mieloblastos, além de eosinofilia e basofilia

Hemoglobina (g/dL)	**10,1**
Leucócitos (/mm^3)	125.000
Mieloblastos	3%
Promielócitos	2%
Mielócitos	10%
Metamielócitos	15%
Bastonetes	8%
Segmentados	37%
Eosinófilos	8%
Basófilos	4%
Linfócitos	13%
Plaquetas (/mm^3)	**650.000**

Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

No mielograma de pacientes com LMC, a medula óssea encontra-se geralmente hipercelular à custa de hiperplasia da série granulocítica, o que acentua a razão entre séries granulocítica e eritroide (que normalmente é de 2:1) para > 3:1. A avaliação citogenética na LMC é fundamental para o diagnóstico em virtude da presença do cromossomo Ph em mais de 95% dos pacientes. O cromossomo Ph é o cromossomo 22 encurtado, resultante da translocação recíproca entre braço longo do cromossomo 9 e o braço longo do cromossomo 22: *t(9q+; 22q-)*. Neste cromossomo, a translocação resulta na formação do gene quimérico *BCR-ABL*, que pode ser amplificado por técnica de PCR para monitorização de resposta ao tratamento.

A LMC é uma doença trifásica. Em 85% dos casos, o diagnóstico de LMC é feito na fase inicial, denominada fase crônica. Nessa fase, os pacientes apresentam leucocitose com poucos (ou nenhum) blastos circulantes no hemograma e esplenomegalia, ambos geralmente responsivos e controlados com o tratamento. Com a progressão da doença, pode ocorrer a fase acelerada, caracterizada por intensificação da leucocitose com aumento do número de blastos e basófilos, aparecimento de anemia e plaquetopenia não relacionadas ao tratamento, além da piora da esplenomegalia e necessidade de aumentos frequentes das doses da medicação para tratamento. Por fim, a doença pode progredir para a sua fase mais grave, a crise blástica, determinada pela presença de pelo menos 20% de blastos no sangue periférico ou na medula óssea. Vale ressaltar que cerca de 75% das crises blásticas são mieloides (mieloblastos), mas 25% são linfoides, com proliferação de linfoblastos.

LINFOMAS

Os linfomas representam as neoplasias hematológicas mais comuns no mundo (Figura 51.12) e compreendem um vasto grupo de doenças que se desenvolvem no tecido linfoide, podendo ser originados nos linfonodos (linfomas nodais) ou fora deles (linfomas extranodais). Na maioria das vezes, o diagnóstico dos linfomas é anátomo-patológico, por meio da análise de biópsia obtida do tecido linfoide acometido. Com base no padrão histopatológico, os linfomas são subdivididos em linfomas de Hodgkin (LH) e linfomas não Hodgkin (LNH), os quais são ainda subclassificados em agressivos e indolentes.

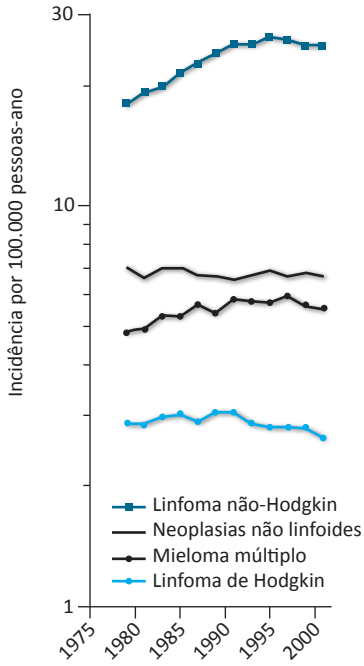


Figura 51.12 Incidência das neoplasias hematológicas nos EUA, com destaque para o grande número de casos novos de linfoma não Hodgkin.
Fonte: Adaptada de Morton LM e colaboradores. *Blood* 2006.

Os LNH compreendem um grupo com mais de 30 doenças diferentes, respondem por 75% dos linfomas e, ao contrário da apresentação geralmente unifocal e ganglionar dos LH, se caracterizam pelo acometimento extranodal em 40% dos casos (Tabela 51.5). A incidência dos LNH aumenta com a idade, sendo que os subtipos indolentes são mais frequentes em idosos e os agressivos em pacientes mais jovens. Já o LH caracteristicamente apresenta seu pico de incidência na terceira década de vida.

O diagnóstico dos linfomas é essencialmente histopatológico, baseado no aspecto das células neoplásicas, no infiltrado inflamatório adjacente e no desarranjo causado pela doença na arquitetura do tecido envolvido, geralmente o linfonodo. A morfologia das células no tecido acometido é muitas vezes típica, como a presença da célula de Reed-Sternberg, que é patognomônica do LH (Figura 51.13). No entanto, na maioria dos casos há a necessidade de complementar a histologia com o estudo imunohistoquímica para a definição do diagnóstico.

Os linfomas nodais praticamente não alteram o hemograma, de forma que a participação do laboratório clínico é geralmente pequena na confirmação diagnóstica dessas doenças. A exceção fica por conta de certos linfomas que se originam na medula óssea ou a infiltram, assumindo a apresentação leucêmica (linfomas "leucemizados").

Tabela 51.5 Classificação das neoplasias linfoproliferativas de linhagem B e T pela OMS.

Neoplasoas de células B (85%)	Neoplasias de células T (15%)
Precursora	**Precursora**
• LLA-B/Linfoma linfoblástico B*	• LLA-B/Linfoma linfoblástico T*
Madura (periférica)	**Madura (periférica)**
• LLC/Linfoma linfocíto†	• Leucemia prolingocítica T†
• Leucemia prolinfocítica B†	• Leucemia de grandes linfócitos granulares*
• Linfoma linfoplasmicítico†	• Leucemia de células NK*
• Linfoma esplênico da zona marginal†	• Leucemia/Linfoma de células T do adulto (ATLL)*
• Tricoleucemia†	• Linfoma extranodal de células T/NK tipo nasal*
• Mieloma plasmocítico/ Plasmocitoma†	• Linfomas de células T tipo enteropatia*
• Linfoma MALT†	• Linfoma hepatoesplênico tipo λ-δ*
• Linfoma nodal de células B da zona marginal†	• Linfoma de células T tipo paniculite*
• Linfoma folicular†	• Micose fungoide/ síndrome de Sézary†
• Linfoma das células do manto‡	• Linfoma cutâneo primário anaplástico*
• Linfoma disufo de grande células B*	• Linfoma anasplástico*
• Linfome de Burkitt*	• Linfoma angioimunoblástico*
	• Linfoma de células T periférico, não caracterizado*

* Agressivo; †Indolente; ‡Indolente, porém com progressão rápida
Fonte: Vardiman JW, *et al.* Blood. 2009;114:937-51.

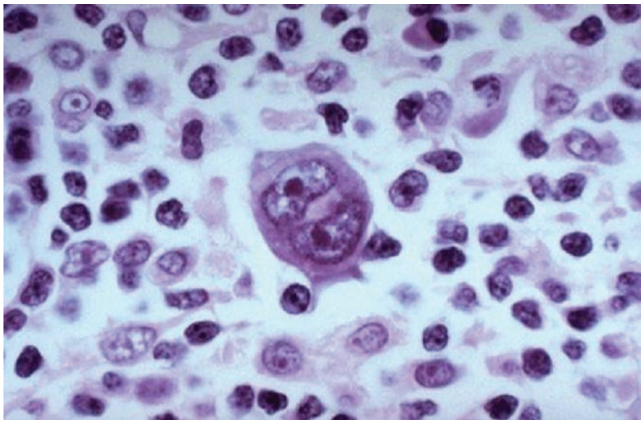


Figura 51.13 Célula de Reed-Sternberg (ao centro) em medula óssea infiltrada por LH.
Fonte: Hoffbrand AV. Color atlas of clinical hematology. 3ª edição.

Linfomas "leucemizados"

Nos linfomas leucemizados, as células oriundas do linfoma mantêm as características morfológicas e fenotípicas do tecido neoplásico que as originou. Os principais linfomas leucemizados oriundos de células B e suas respectivas características morfológicas são: *linfoma linfoplasmocítico*, cujas células neoplásicas apresentam diferenciação plasmocitoide (linfócitos linfoplasmocitoides) com núcleo deslocado para a periferia da célula e citoplasma moderadamente abundante e basofílico; *linfoma da zona do manto*, com células maiores e mais pleomórficas que as da LLC e do linfoma folicular, com volume citoplasmático variável e núcleo discretamente indentado, exibindo cromatina pouco condensada e, por vezes, nucléolos; *linfoma esplênico da zona marginal* com linfócitos vilosos, pouco maiores que os da LLC, apresentando alta relação nucleocitoplasmática e vilosidades curtas e finas, geralmente confinadas a um dos polos da célula; *tricoleucemia*, também conhecida por leucemia de células "cabeludas", caracterizada por células grandes com núcleo geralmente oval, exibindo cromatina parcialmente condensada (podendo conter nucléolos), além de citoplasma abundante com projeções citoplasmáticas delicadas, que se assemelham a fios de cabelo. Dentre os linfomas T, destacam-se a *leucemia/linfoma de células T do adulto* (ATLL), que se caracteriza pela grande quantidade de linfócitos de tamanho pequeno e médio, com núcleo irregular, geralmente multilobado, assumindo, por vezes, forma de trevo ou flor (*flower cell*), e a *síndrome de Sézary*, geralmente representando a fase leucêmica de um linfoma cutâneo, denominado micose fungoide, caracterizada pela presença de linfócitos neoplásicos pequenos com núcleo convoluto de aspecto cerebriforme (Figura 51.14).

Assim, nos linfomas leucemizados, o hemograma é geralmente a fonte inicial da suspeita diagnóstica, embora raramente a morfologia permita um diagnóstico preciso da doença em questão. Dessa forma, testes adicionais, como a imunofenotipagem, são frequentemente realizados em amostras do sangue periférico ou da medula óssea para que, aliados à morfologia, auxiliem na confirmação do diagnóstico. A Tabela 51.6 mostra, em linhas gerais, o painel imunofenotípico utilizado para confirmação e diagnóstico diferencial das neoplasias linfoides leucemizadas de células B.

Tabela 51.6 Classificação imunofenotípica das doenças linfoproliferativas crônicas de células B.

Doença	IgS	IgC	CD5	CD10	CD23	CD43
LLC	+	–/+	+	–	+	+
LLP	+	+	–	–	–	–/+
LM	+	–	+	–/+	–	+
LF	+	–	–	+/–	–/+	–
LZM	+	–/+	–	–	–/+	–/+
LCC	+	–/+	–	–	–	–

LLC – leucemia linfoide crônica; LLP – linfoma linfoplasmocítico; LM – linfoma da zona do manto; LF – linfoma folicular; LZM – linfoma da zona marginal; LCC – leucemia de células cabeludas; IgS – imunoglobulina de superfície; IgC – imunoglobulina citoplasmática.
Fonte: Bain B. Células sanguíneas: um Guia Prático. 4ª Edição.

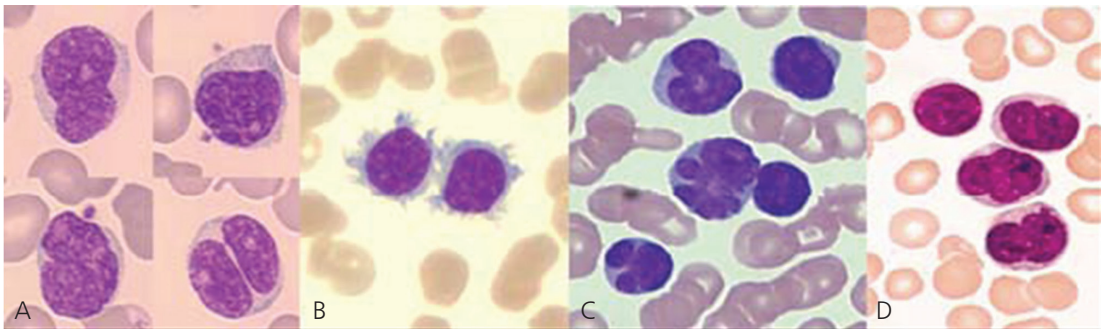


Figura 51.14 Citologia do sangue periférico em alguns linfomas leucemizados. **(A)** linfoma das células do manto; **(B)** tricoleucemia; **(C)** leucemia/linfoma de células T do adulto; **(D)** síndrome de Sézary.
Fonte: Adaptada do livro Doenças que Alteram os Exames Hematológicos – Naoum FA.

MIELOMA MÚLTIPLO

O mieloma múltiplo representa 1% de todos os tipos de câncer e 10% das neoplasias hematológicas. A média de idade ao diagnóstico é de 65 anos. Essa doença caracteriza-se pela proliferação clonal e descontrolada de plasmócitos maduros na medula óssea, o que resulta na produção de uma proteína monoclonal ("proteína M"), geralmente uma imunoglobulina ou seus fragmentos.

Na maioria dos casos, o quadro clínico consiste de cansaço e fraqueza devido à anemia e de dor óssea por conta de fraturas, microfraturas, lesões líticas ou osteopenia grave. Ocasionalmente, alguns pacientes também podem apresentar insuficiência renal e distúrbio metabólico (p. ex.: hipercalcemia) ao diagnóstico.

O hemograma geralmente revela anemia normocítica e normocrômica, e na análise do esfregaço sanguíneo observa-se a presença do fenômeno de "Rouleaux" (empilhamento de hemácias) em moderada a acentuada intensidade (Figura 51.15). Com exceção dos casos de doença avançada ao diagnóstico, não se costuma observar plasmócitos no sangue periférico dos pacientes com mieloma múltiplo.

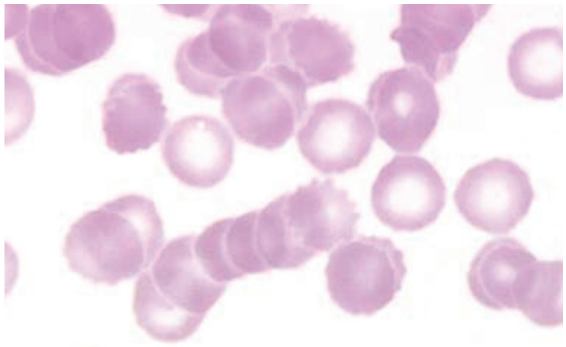


Figura 51.15 Fenômeno de Rouleaux no sangue periférico de paciente com mieloma múltiplo.
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

A confirmação diagnóstica dos casos suspeitos requer a coleta de mielograma evidenciando pelo menos 10% de plasmócitos na medula óssea e a identificação da proteína monoclonal por meio de pico monoclonal na eletroforese de proteínas no sangue ou na urina (proteína de Bence-Jones), e também pelo teste de imunofixação no sangue e na urina para confirmar com maior sensibilidade o caráter monoclonal da doença (Figura 51.16). A presença de lesão orgânica relacionada ao mieloma distingue a apresentação sintomática e a assintomática dessa doença.

Ainda no contexto diagnóstico, a imunofenotipagem pode ser utilizada para caracterizar melhor a população plasmocitária na medula óssea. Para análise de prognóstico, recomenda-se realização de citogenética e, se disponível, do teste *heavy lite ratio* e cadeias leves, que também serve para monitorar a resposta ao tratamento.

SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

As síndromes mielodisplásicas (SMD) são doenças clonais da medula óssea caracterizadas por falência medular e risco elevado de transformação para LMA. A doença afeta principalmente idosos e o principal mecanismo fisiopatológico é a hematopoiese ineficaz, em que o tecido hematopoiético, embora mantenha a capacidade de proliferação, não consegue sustentar as etapas normais de maturação e diferenciação celular, reduzindo a produção de células sanguíneas maduras e funcionais.

O quadro clínico nessa doença se relaciona com a citopenia vigente, como cansaço na apresentação de anemia e sangramentos cutâneos e mucosos nos casos de plaquetopenias acentuadas.

A suspeita de SMD geralmente se dá pela observação de citopenia isolada, bicitopenia ou pancitopenia no hemograma, que se apresentam de forma persistente e não responsivas a tratamentos convencionais.

A hematopoiese ineficaz que caracteriza a fisiopatologia da SMD é repercutida pelas citopenias no sangue periférico

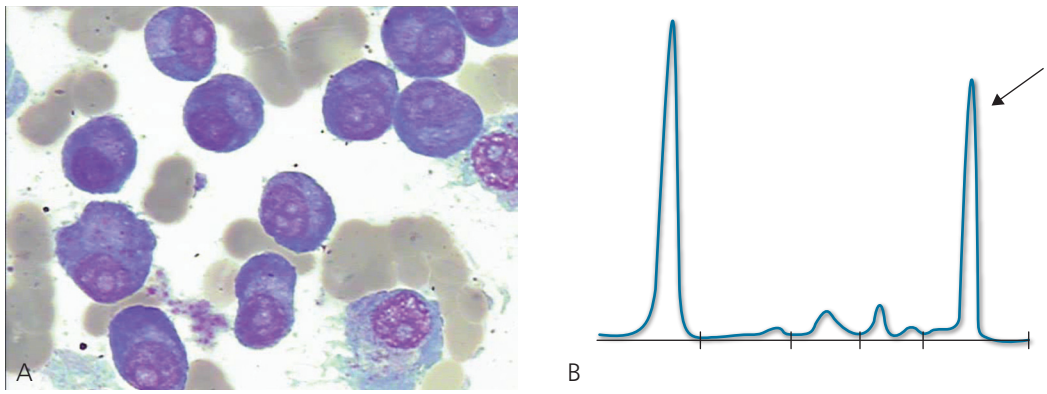


Figura 51.16 Plasmocitose com plasmócitos displásicos em mielograma de paciente com mieloma múltiplo **(A)**, e pico monoclonal (seta) na eletroforese de proteínas **(B)**.
Fonte: Adaptada do livro Doenças que Alteram os Exames Hematológicos – Naoum FA.

contrastando com a hipercelularidade na medula óssea em boa parte dos casos.

A confirmação diagnóstica requer uma análise cuidadosa e minuciosa de, ao menos, 200 células no esfregaço sanguíneo e de 500 células no mielograma. No mielograma, deverá ser atestada a presença de pelo menos 10% de displasia em uma ou mais linhagens. A combinação das alterações do sangue periférico e da medula óssea ainda representa a base para a classificação das SMD pela OMS, que já conta também com um subtipo classificado pela citogenética (Tabela 51.7).

Tabela 51.7 Classificação das síndromes mielodisplásicas pela OMS.

- Citopenia refratária com displasia unilinhagem
- Anemia refratária com sideroblastos em anel
- Citopenia refratária com displasia multilinhagem (com ou sem sideroblastos em anel)
- Anemia refratária com excesso de blastos
- SMD com deleção do 5q
- SMD não classificada
- Síndrome mielodisplásica da infância

Fonte: Vardiman JW, *et al.* Blood. 2009;114:937-51.

As análises citológicas da medula óssea e do sangue periférico são fundamentais para o diagnóstico, porém são difíceis e trabalhosas, exigindo conhecimento e experiência do citologista. No sangue periférico, a anemia tende a macrocitose com destaque para o aumento do número de marovalócitos, além de anisopoiquilocitose frequente (Figura 51.17). Com relação à morfologia dos granulócitos, merecem ressalva a presença de hipogranulação, hipossegmentação e a presença de alguns mieloblastos circulantes (Figura 51.18).

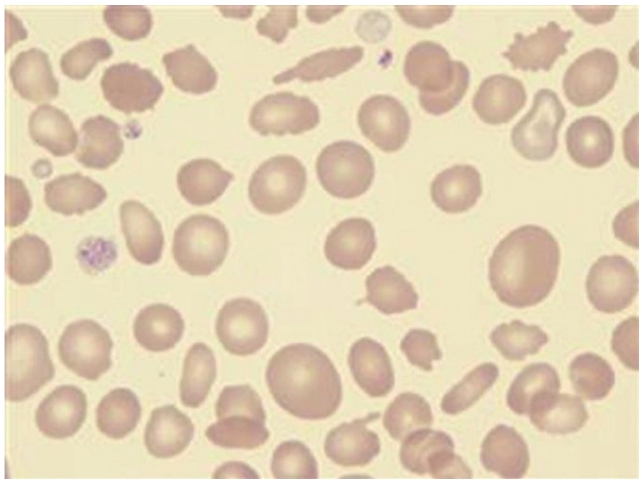


Figura 51.17 Anisopoiquilocitose com macrovalócitos no sangue periférico de paciente com SMD.
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

As alterações granulocíticas observadas no sangue periférico também se repetem na medula óssea, com destaque para a presença de assincronismo de maturação núcleo/citoplasma e o aumento do número de mieloblastos (mas abaixo de 20%, caso contrário trata-se de LMA). Em relação aos eritroblastos, são características a megaloblastose, a multinuclearidade, as pontes internucleares e o assincronismo de maturação (Figura 51.19). Na série megacariocítica destacam-se a presença de micromegacariócitos e formas com núcleo hipolobulado (monoformas) (Figura 51.20).

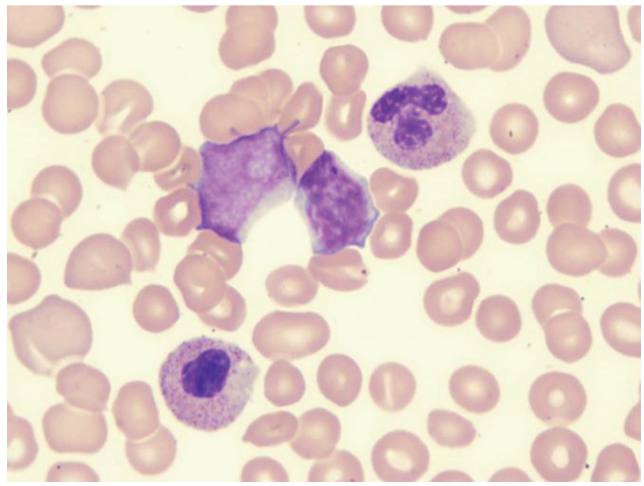


Figura 51.18 Neutrófilo hipossegmentado ou pseudo-Pelger (abaixo) no sangue periférico de paciente com SMD.
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

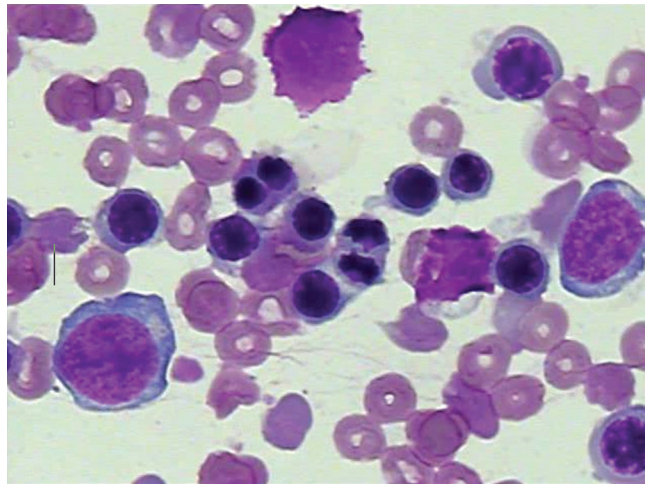


Figura 51.19 Mielograma de paciente com SMD evidenciando hiperplasia da série vermelha com dois megaloblastos (um à esquerda e outro à direita), além de uma forma binucleada e uma figura de mitose (ambas ao centro).
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

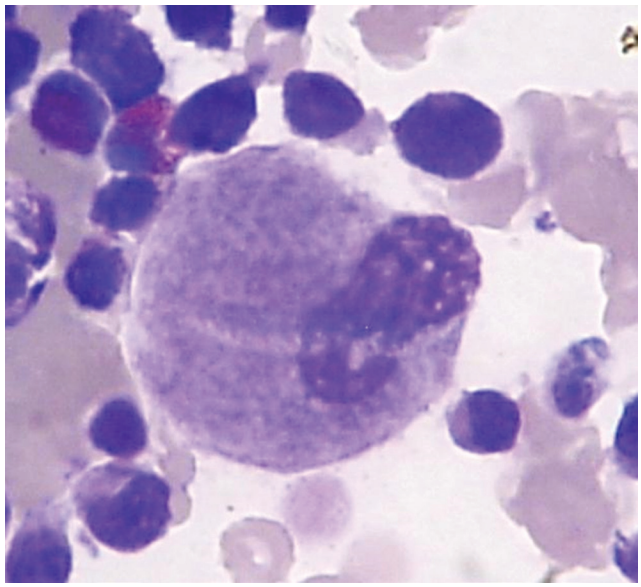


Figura 51.20 Micromegacariócito com núcleo hipolobulado.
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

É cada vez mais frequente na SMD a complementação do diagnóstico morfológico com o auxílio da imunofenotipagem do aspirado medular e da biópsia de medula óssea, a qual revela alterações importantes como a disposição paratrabecular dos eritroblastos e a disposição central dos blastos (ALIP – *abnormally localized immature precursors*).

A presença de pelo menos 5% de blastos no mielograma é fundamental na definição do subtipo 'Anemia refratária com excesso de blastos' (AREB), que é ainda subdividido em tipo I (com 5% a 9% de mieloblastos) e tipo II (com 10% a 19% de mieloblastos), sendo este último o de maior gravidade pelo elevado risco de transformação para LMA.

Além disso, o diagnóstico de certos subtipos de SMD depende também da utilização de recursos adicionais como a coloração de Perls e a citogenética. A coloração de Perls (coloração para ferro medular) permite o diagnóstico do subtipo 'Anemia refratária com sideroblastos em anel', por revelar em ao menos 15% dos eritroblastos a presença de ferro acumulado nas suas mitocôndrias dispostas ao redor do núcleo, o que lhes confere a denominação 'sideroblastos em anel' (Figura 51.21).

Quanto à citogenética, a presença da deleção 5q no cariótipo dos pacientes confirma o diagnóstico do subtipo associado a esta alteração. Na verdade, o estudo citogenético é recomendável para todos os casos suspeitos de SMD. Cerca de metade dos pacientes apresentam cariótipo normal, sendo que nos casos alterados predominam as perdas cromossômicas. As alterações mais comuns são as perdas parciais ou completas dos cromossomos 5 e 7, trissomia do 8, 20q- ou cariótipo complexo. No momento, vários marcadores moleculares estão sendo pesquisados, com destaque para a mutação EZH2, associada a um pior prognóstico.

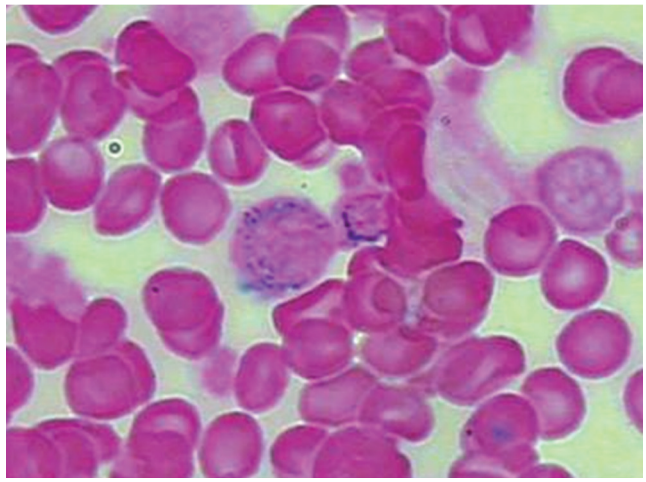


Figura 51.21 Coloração de Perls na medula óssea evidenciando dois sideroblastos em anel (ao centro).
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

As neoplasias mieloproliferativas (NMP), anteriormente denominadas doenças mieloproliferativas crônicas, são doenças clonais da célula-tronco hematopoiética, nas quais há proliferação aumentada das séries mieloides com maturação eficaz, resultando em leucocitose no sangue periférico e aumento da massa eritrocitária ou plaquetose. Há risco variável de progressão para mielofibrose ou de transformação leucêmica. A Tabela 51.8 lista os diversos subtipos de NMP.

Tabela 51.8 Classificação das neoplasias mieloproliferativas pela OMS.

Neoplasias mieloproliferativas
Leucemia mieloide crônica, *BCR-ABL1* positivo
Leucemia neutrofílica crônica
Policitemia Vera
Mielofibrose primária
Trombocitemia essencial
Leucemia eosinofílica crônica, não especificada
Mastocitose Neoplasias Mieloides associadas à eosinofilia e a mutações *PDGFRA, PDGFRB* ou *FGFR1*
Neoplasia mieloproliferativa, inclassificável

Fonte: Vardiman JW, *et al*. Blood. 2009;114:937-51.

Em geral, as NMP compartilham aspectos clínicos e fisiopatológicos em comum como a hipercelularidade da medula óssea, a presença de esplenomegalia, o risco de transformação para LMA ou mielofibrose, o risco de hemorragia e trombose, e a presença da mutação *JAK2 V617F*.

A descoberta da mutação JAK2 representou um grande avanço diagnóstico, já que pode ser detectada em boa parte dos pacientes com NMP. Além disso, também possibilitou melhor compreensão da fisiopatologia dessa doença, uma vez que as JAK2 mutantes são tirosinoquinases com ativação constitucional que estimulam a hematopoiese de forma autônoma e clonal.

Neste tópico abordaremos as principais NMP caracterizadas pela ausência do cromossomo Philadelphia (Ph): Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária.

Policitemia Vera

A Policitemia Vera (PV) é uma doença neoplásica clonal caracterizada principalmente pelo aumento do volume total da massa eritrocitária independentemente da ação dos mecanismos habituais de regulação da eritropoese, além do aumento menos pronunciado da produção de leucócitos e plaquetas (panmielose).

Nessa doença, a média de idade ao diagnóstico é de 55 a 60 anos, e o quadro clínico se caracteriza por pele avermelhada, por vezes com pletora, prurido (especialmente após banho quente), esplenomegalia, além de sinais de hiperviscosidade sanguínea em alguns casos. Dentre as complicações clínicas que podem ocorrer, a mais preocupante é a trombose venosa ou arterial.

No hemograma observa-se eritrocitose acentuada, geralmente acompanhada de neutrofilia e plaquetose de discreta a moderada intensidade (Figura 51.22). Após um tempo de evolução, pode ocorrer microcitose e hipocromia devido à depleção dos estoques de ferro por conta a eritropoese acelerada. A PV deve ser suspeitada pelo hemograma quando a hemoglobina estiver acima de 18,5 g/dL em homens e 16,5 g/dL nas mulheres, ou glóbulos vermelhos acima de 6,6 milhões/dL em homens e 5,9 milhões/dL nas mulheres.

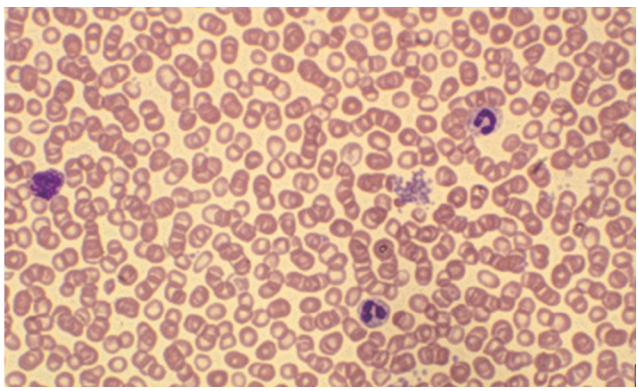


Figura 51.22 Eritrocitose no esfregaço de sangue periférico de portador de Policitemia Vera.
Fonte: Adaptada do livro Doenças que alteram os exames hematológicos – Naoum FA.

Após a suspeita, a confirmação diagnóstica dependerá da realização de testes adicionais (Tabela 51.9). Do ponto de vista prático, a determinação da eritropoietina sérica representa o primeiro passo de investigação, uma vez que se encontra normal ou diminuída na PV, ao contrário do que ocorre nas poliglobulias reacionais.

Tabela 51.9 Critérios para diagnóstico de Policitemia Vera.*

Critérios maiores
1. Hb > 18,5 g/dL (homem) ou > 16,5 g/dL (mulher)
2. Mutação JAK2 V617F presente ou mutação similar
Critérios menores
1. Biópsia de medula óssea hipercelular com hiperplasia das 3 séries (panmielose)
2. Eritropoetina sérica diminuída
3. Formação endógena de colônias eritroides *in vitro*

* Para confirmação diagnóstica são necessários 2 critérios maiores e 1 menor, ou 1 critério maior e 2 menores.
Fonte: Vardiman JW, *et al.* Blood. 2009;114:937-51.

A seguir, recomenda-se a pesquisa da mutação *JAK2 V617F* que está presente em 95% dos pacientes com PV, representando um excelente marcador diagnóstico, mesmo não sendo exclusivo dessa doença. Igualmente importante é o estudo da medula óssea, preferencialmente por biópsia de medula óssea, que revela hipercelularidade com hiperplasia trilinhagem, além da presença de ilhotas de eritroblastos, aumento de precursores granulocíticos e atipias megacariocíticas.

A PV apresenta baixo risco de evolução para mielofibrose ou transformação para LMA, e a sobrevida média pode ser superior a 20 anos. O diagnóstico diferencial deve ser feito com as poliglobulias reacionais, que normalmente têm na sua base fisiopatológica a ocorrência de hipóxia arterial (p. ex.: tabagismo acentuado e crônico, DPOC, cardiopatias congênitas etc.).

Trombocitemia essencial

Na Trombocitemia Essencial (TE), a média de idade ao diagnóstico é de 60 anos, sendo que dois terços dos pacientes são do sexo feminino. A doença apresenta baixo risco de evolução para mielofibrose ou LMA, e a sobrevida é próxima daquela observada na população normal.

A esplenomegalia geralmente consiste na única alteração clínica. Paradoxalmente, há risco de hemorragia e trombose nessa doença, e isso se explica pelas alterações de função plaquetária que acompanham a plaquetose extrema. Assim, se houver tendência à agregação espontânea, ocorre risco de trombose; de outra forma, a plaquetose acentuada pode levar

à Doença de von Willebrand adquirida, facilitando a ocorrência de hemorragias.

No hemograma, a principal alteração é a plaquetose com contagens geralmente acima de 1 milhão/dL, com presença de frequentes plaquetas gigantes e macroplaquetas no esfregaço, condizendo com as elevações do VPM e PDW (Figura 51.23). Em um terço dos casos observa-se também neutrofilia.

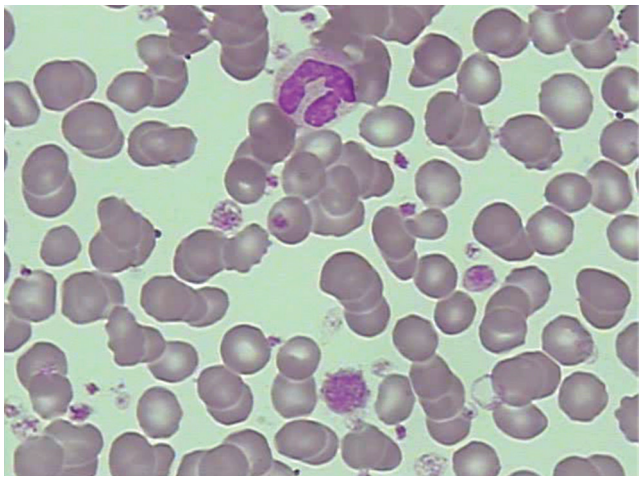


Figura 51.23 Plaquetose com macroplaquetas e plaqueta gigante (abaixo) no esfregaço sanguíneo de portador de Trombocitemia Essencial.
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

A mutação JAK2V617F está presente em cerca de metade dos pacientes com TE.

Na medula óssea, há geralmente um aumento acentuado do número de megacariócitos, que se mostram grandes, hiperlobulado e aglomerados (Figura 51.24). O diagnóstico da TE é de exclusão, como demonstra a Tabela 51.10, de forma que a realização da biópsia de medula óssea não só auxilia na confirmação do diagnóstico por conta das alterações já descritas na série megacariocítica, como também afasta outras hipóteses pelas ausências de desvio à esquerda significativo na granulopoiese e de fibrose relevante.

Tabela 51.10 Critérios para diagnóstico de Trombocitemia Essencial.*

Critérios
1. Plaquetometria persistentemente > 450 × 10^9/L
2. BMO: proliferação proeminente de linhagem megacariocítica, com aumento do número de grandes megacariócitos maduros. Ausência de aumento significante ou desvio à esquerda da granulopoiese ou eritropoese.
3. Não preencher critérios (OMS) para PV, MFP, LMC *BCR-ABL* pos, SMD ou outra neoplasia mieloide.
4. Presença de JAK2 V617F ou outro marcador clonal. Se ausente, excluir trombocitose reacional.

* A confirmação diagnóstica requer a presença dos quatro critérios.
Fonte: Vardiman JW, *et al*. Blood. 2009;114:937-51.

O diagnóstico diferencial se faz com outras NMP em que a plaquetose pode representar a manifestação inicial como PV, LMC e mielofibrose, e também com plaquetoses reacionais, que raramente ultrapassam 1 milhão/dL, e que podem ser causadas por processos infecciosos, inflamatórios e ferropenia, entre outras situações.

MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

A Mielofibrose Primária (MF) tem seu pico de incidência por volta dos 65 anos de idade e representa o subtipo mais raro entre os comentados neste tópico, porém é o de maior gravidade, com redução considerável na sobrevida.

Trata-se de uma neoplasia clonal da célula-tronco hematopoiética em que megacariócitos anômalos estimulam

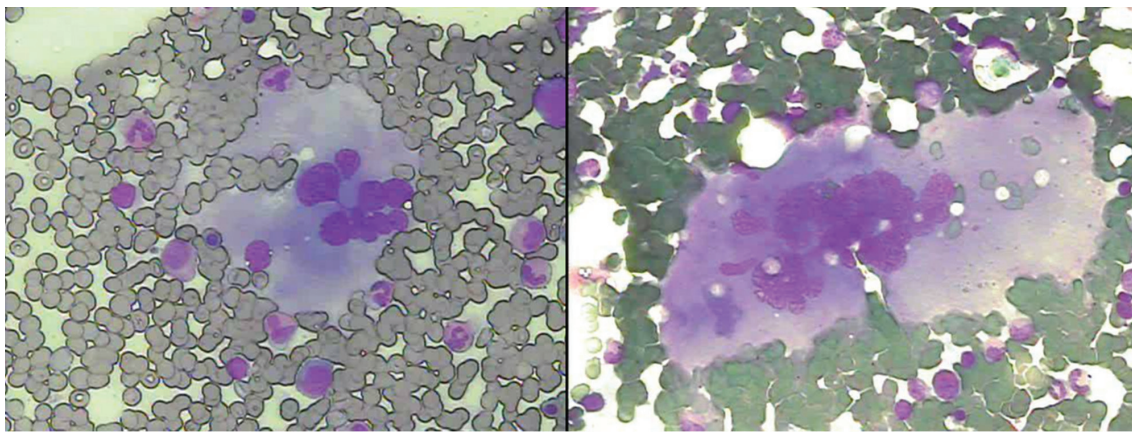


Figura 51.24 Megacariócitos de tamanho aumentado e com núcleo hiperlobulado em mielograma de portador de Trombocitemia Essencial.
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

a proliferação reacional de fibroblastos na medula óssea, levando a um quadro de fibrose medular. A fibrose medular é acompanhada da tentativa de compensação da hematopoiese por outros órgãos (hematopoiese extramedular), notadamente o baço, daí a denominação 'mielofibrose com metaplasia mieloide agnogênica'.

A maioria dos pacientes apresenta sintomas ao diagnóstico decorrentes da insuficiência da medula óssea causada pela fibrose (anemia, neutropenia e plaquetopenia), além de emagrecimento e desconforto abdominal por conta de esplenomegalia, por vezes volumosa.

Na fase fibrótica, o hemograma geralmente revela pancitopenia, mais pronunciada com relação à anemia, e a análise minuciosa do esfregaço sanguíneo pode detectar número elevado de dacriócitos associado a quadro leucoeritroblástico (Figura 51.25). Denomina-se quadro leucoeritroblástico a presença de eritroblastos circulantes em conjunto com precursores granulocíticos e, por vezes, blastos no sangue periférico.

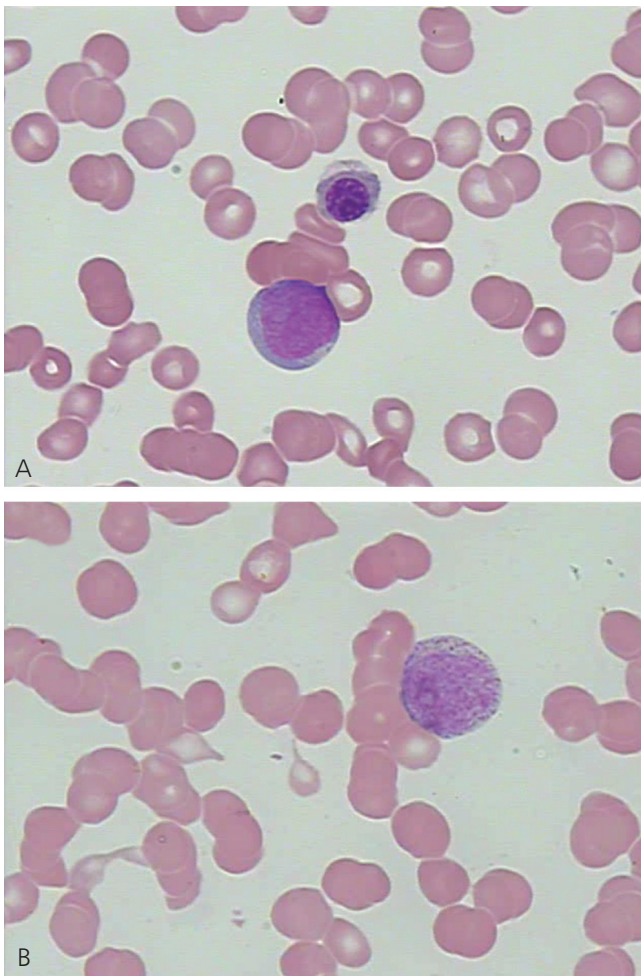


Figura 51.25 Quadro leucoeritroblástico (sangue periférico). **(A)** Eritroblasto e mieloblasto circulantes; **(B)** Promielócito e dacriócitos.
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

A fibrose medular frequentemente impede a coleta do aspirado medular ('punção seca' ao mielograma), de forma que a biópsia de medula óssea representa o método diagnóstico de escolha para a investigação diagnóstica. A biópsia de medula na MF demonstra presença de fibrose reticulínica ou do colágeno, com celularidade irregular, número elevado de megacariócitos anômalos a atípicos, formando agrupamentos densos, além de dilatação dos sinusoides medulares (Figuras 51.26 e 51.27).

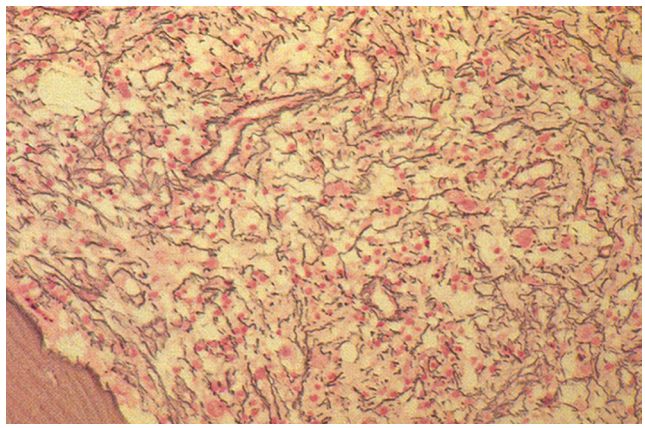


Figura 51.26 Fibrose reticulínica (filamentos escuros) revelada pela coloração da reticulínica na medula óssea de portador de mielofibrose (biópsia de medula óssea).
Fonte: Hoffbrand AV. Clinical Hematology, 1994.

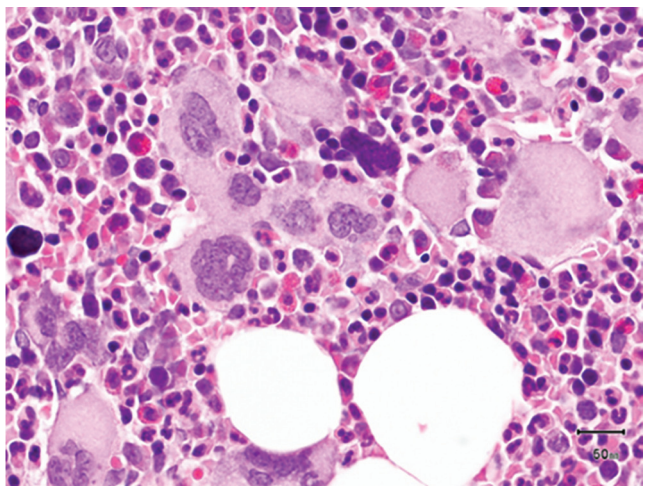


Figura 51.27 Agrupamento de megacariócitos anômalos (ao centro) na medula óssea de portador de mielofibrose (biópsia de medula óssea).
Fonte: BMJ best practice. Disponível em: http://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/1132

A mutação JA2 V617F está presente em cerca de 40% dos casos e as anormalidades citogenéticas em 50% (as quais são de trabalhosa detecção pela dificuldade de se puncionar a medula óssea).

A Tabela 51.11 descreve os critérios necessários para confirmação do diagnóstico de MF.

Tabela 51.11 Critérios para diagnóstico de Mielofibrose Primária.*

Critérios maiores
1. Proliferação de megacariócitos com atipia, geralmente acompanhada de fibrose reticulínica ou colágena.
2. Não preencher critérios para PV, LMC, SMD ou outras neoplasias mieloides.
3. Presença de mutação *JAK2 V617F* ou outro marcador clonal. Se ausentes, excluir mielofibrose secundária.
Critérios menores
1. Quadro leucoeritroblástico.
2. DHL elevado.
3. Anemia.
4. Esplenomegalia palpável.

* Para a confirmação diagnóstica são necessários ao menos 3 critérios maiores e 2 menores.

Fonte: Vardiman JW, *et al*. Blood. 2009;114:937-51.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Avvisati G, Lo Coco F, Mandelli F. Acute promyelocytic leukemia: clinical and morphologic features and prognostic factors. Semin Hematol. 2001;38:4-12.
2. Bain BJ, Barnett D, Linch D, et al. Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. Clin Lab Haem. 2002;24:1-13.
3. Bain BJ. Células sanguíneas: um guia prático. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p.488.
4. Bain BJ. Diagnosis from the blood smear. N Eng J Med. 2005;353:498-507.
5. Bain JB. Diagnóstico em leucemias. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. p.171.
6. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. J Clin Oncol. 2011;29:761-80.
7. Barosi G, Hoffman R. Idiopathic myelofibrosis. Semin Hematol. 2005;42:248-58.
8. Basso G, Buldini B, De Zen L, et al. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. Haematologica. 2001;86(7):675-92.
9. Bellanti JA, Kadlec JV, Escobar-Gutiérrez A. Cytokines and the immune response. Pediatr Clin North Am. 1994;41(4):597-621.
10. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol. 1976;33(4):451-8.
11. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia. Hematology. 2004:163-83.
12. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, et al. Mechanisms of disease: the biology of chronic myeloid leukemia. N Eng J Med. 1999;341(3):164-72.
13. Failace R. Hemograma: manual de interpretação. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. p.298.
14. Goodman GR, Bethel KJ, Saven A. Hairy cell leukemia: na update. Curr Opin Hematol. 2003;10:258-66.
15. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukemia. Lancet. 2007;370:342-50.
16. Hoffbrand AV, Lewis SM, Tuddenham EG. Postgraduate haematology. 4.ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1999. p.722.
17. Hoffbrand AV, Mehta AB. Haematology at a glance. 2.ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2005. p.117.
18. Howard MR, Hamilton PJ. Haematology: an illustrated colour text. 3.ed. Philadelphia: Elsevier Ltd, 2008. p.124.
19. Janeway CA, Travers P, Walport M, et al. Imunobiologia – o sistema imune na saúde e na doença., 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p.824.
20. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, et al. Cellular Origin of Human B-Cell Lymphomas. N Eng J Med. 1999;341:1520-9.
21. Lelièvre H, Ferrand A, Mozziconacci MJ, et al. Myeloproliferative disorders: premalignant, stem cell, G1 diseases? Leukemia. 2006;20:1475-80.
22. Levine PH, Cleghorn F, Manns A, et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma: a working point-score classification for epidemiological studies. Int J Cancer. 1994;59:491-3.
23. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. N Eng J Med. 1999;341(14):1051-61.
24. Maynadié M, Girodon F, Manivet-Janoray I, et al. Twenty-five years of epidemiological recording on myeloid malignancies: data from the specialized registry of hematologic malignancies of Côte d'Or (Burgundy, France). Haematologica. 2011;96:55-61.
25. Michiels JJ, Thiele J. Clinical and pathological criteria for the diagnosis of essential thrombocytopenia, polycythemia vera, and idiopathic myelofibrosis (agnogenic myeloid metaplasia). Int J Hematol. 2002;76:133-45.
26. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, et al. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. Blood. 2006;107:265-76.
27. Naoum FA, Naoum PC. Hematologia laboratorial: leucócitos. São José do Rio Preto: Academia de Ciência e Tecnologia, 2006. p.144.
28. Naoum FA. Doenças que alteram os exames hematológicos. São Paulo: Atheneu, 2010. p.220.
29. Oscier D, Fegan C, Hillmen P, et al. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 2004;125:294-317.
30. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. Lancet. 2001;357:1777-89.
31. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, et al. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia. Am J Med. 2004;117:755-61.
32. Playfair JHL, Lydyard PM. Medical Immunology: made memorable. 2.ed. London: Churchill Livingstone, 2000. p.108.
33. Provan D, Singer CRJ, Baglin T, et al. Clinical Haematology. OUP, 2009.
34. Provan D, Singer CRJ, Baglin T, et al. Oxford handbook of clinical haematology. Oxford: Oxford University Press, 2009. p.820.

35. Spivak JL. The blood in systemic disorders. Lancet. 2000;355:1707-12.
36. Steensma DP, Tefferi A. The myelodisplastic syndrome(s): a perspective and review highlighting current controversies. Leuk Res. 2003;27:95-120.
37. Stiene-Martin EA, Lotspeich-Steininger CA, Koepke JA. Clinical hematology: principles, procedures, correlations. 2.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1998. p.817.
38. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4.ed. World Health Organization, 2008. p.441.
39. Tefferi A, Spivak JL. Polycythemia vera: scientific advances and current practice. Semin Hematol. 2005;42:206-20.
40. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. Blood. 2007;110:1092-7.
41. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. Blood. 2007;110:1092-7.
42. Tefferi A. Medical progress - myelofibrosis with myeloid metaplasia. N Eng J Med. 2000;342(17):1255-65.
43. Thiele J. Philadelphia Chromosome–Negative Chronic Myeloproliferative Disease. Am J Clin Pathol. 2009;132:261-80.
44. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 2009;114:937-51.
45. Verrastro T, Lorenzi TF, Wendel Neto S. Hematologia e hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p.316.
46. Wiernik PH. Adult leukemias. Ontario: American Cancer Society, 2001. p.350.
47. Zhan H, Spivak JL. The Diagnosis and Management of Polycythemia Vera, Essential Thrombocythemia, and Primary Myelofibrosis in the JAK2 V617F Era. Clin Adv Hematol Oncol. 2009;7:334-42.
48. Zucker-Franklin D, Grossi CE. Atlas of blood cells – function and pathology. 3.ed. Milano: Edi-ermes, 2003. p.1002.

52

capítulo

Flávio Naoum

Infecções Bacterianas e Virais

INTRODUÇÃO

Os processos infecciosos figuram historicamente entre as maiores causas de óbito no ser humano, de modo que a evolução ao longo de milhares de anos permitiu a formação de um sistema de defesa altamente complexo e eficaz, conhecido por sistema imune. Os princípios do sistema imune baseiam-se no reconhecimento e eliminação de antígenos estranhos, notadamente os agentes infecciosos.

A produção, quantidade e distribuição dos diferentes tipos de leucócitos no sangue periférico são determinadas em grande parte pela atividade do sistema imune. Assim, em condições normais, os valores de referência leucocitários representam, com discretas oscilações, a homeostase da atividade imunológica.

Dessa forma, as alterações que observamos no leucograma na vigência de processos infecciosos nada mais são do que reflexo da atuação do sistema imune para coibir ou eliminar o agente agressor. E, naturalmente, há uma resposta imune distinta e especializada para cada grupo de microrganismos infecciosos (bactérias, vírus, parasitas etc.).

BREVE REVISÃO DA RESPOSTA IMUNE

Os glóbulos brancos integram o sistema imune e, portanto, sua função primordial consiste na resposta imunológica frente a uma agressão ao organismo por agentes infecciosos, tóxicos e tumorais, entre outros. De modo didático, a resposta imunológica é dividida em dois tipos: resposta natural (ou inata; não se altera com o tempo), que é mais rápida, porém pouco precisa a ponto de afetar tecidos normais, e a resposta adaptativa (ou específica; sofre adaptação ao longo da vida), que, embora seja mais demorada, é mais específica e desenvolve memória. Ambos os mecanismos caracterizam-se por apresentarem componentes celulares distintos e propriedades imunes particulares. Neste contexto, os granulócitos e os monócitos fazem parte da resposta natural, ao passo que os linfócitos integram a resposta adaptativa (Tabela 52.1).

A resposta imune adaptativa ainda pode ser subdividida em resposta humoral (mediada por linfócitos B e imunoglobulinas) e resposta celular (mediada por linfócitos T).

Tabela 52.1 Leucócitos e suas funções na resposta imune.

Tipo de leucócito	Função
Neutrófilos	Quimiotaxia tecidual, fagocitose e destruição de microrganismos
Eosinófilos	Fagocitose, liberação de histamina, reatividade brônquica
Basófilos	Liberação de mediadores inflamatórios, como histamina e leucotrienos
Monócitos	Forte ação fagocítica, remove antígenos (principalmente se estiverem ligados a anticorpos e proteínas do complemento), apresentação de antígenos
Linfócitos B	Produção de anticorpos
Linfócitos T CD4	Organização da resposta imune (requer apresentação do antígeno pelo MHC classe II)
Linfócitos T CD8	Citotoxicidade (requer reconhecimento do antígeno apresentado pelo MHC classe I)
Linfócitos *"natural killer"*	Destruição de células que não expressam MHC

Fonte: Adaptada do livro Doenças que Alteram os Exames Hematológicos – Naoum FA.

A ativação e a fase efetora das imunidades natural e adaptativa são mediadas por hormônios proteicos denominados citocinas. Assim, as células do sistema imune frequentemente se comunicam por meio da secreção de citocinas, as quais atuam como mediadoras e reguladoras das respostas imunológicas e inflamatórias.

HEMOGRAMA NAS INFECÇÕES BACTERIANAS

As infecções bacterianas representam a principal causa de neutrofilia na rotina de um laboratório de hematologia. Daí

a importância de se conhecer os detalhes e os padrões numéricos e citológicos normalmente observados no hemograma nessas situações.

Mecanismo das neutrofilias reacionais

Neutrofilia é o nome dado ao aumento do número de neutrófilos circulantes. É importante destacar que, em condições fisiológicas normais, cerca de 50% dos neutrófilos presentes no sangue periférico encontram-se marginados ao endotélio (*pool* marginal), enquanto os outros 50% circulam normalmente (*pool* circulante). O *pool* circulante dos neutrófilos corresponde à fração que é avaliada pela leucometria.

As infecções bacterianas são geralmente acompanhadas de leucocitose às custas do aumento do número de granulócitos. As etapas da fisiopatologia da infecção aguda tendem a se correlacionarem com diferentes alterações observadas no leucograma. Assim, é importante destacar que, na fase inicial de uma infecção bacteriana, o processo inflamatório promove o recrutamento dos neutrófilos marginados ao endotélio e também de uma parte dos circulantes para o local da infecção; nesse primeiro momento, o leucograma pode apresentar-se com leucopenia. Com a potencialização e organização da resposta imune – que leva horas ou dias para ocorrer – há repercussão sistêmica com liberação de citocinas, que estimulam a produção de neutrófilos pela medula óssea; nessa fase da infecção é comum a presença de leucocitose. A intensidade da neutrofilia depende de alguns fatores, como virulência do microrganismo, idade e estado de saúde do indivíduo. Por exemplo, crianças parecem apresentar neutrofilias mais intensas que adultos; por outro lado, pacientes idosos, desnutridos ou imunocomprometidos, podem apresentar resposta branda ou fraca frente à mesma infecção. Dentre as bactérias, os cocos Gram-positivos são os que mais causam neutrofilia. No entanto, infecções por bactérias Gram-negativas também podem cursar com leucocitose e neutrofilia no hemograma.

Além disso, é importante diferenciar as neutrofilias reacionais por infecção das neutrofilias que ocorrem por estímulos fisiológicos, as quais resultam da mobilização de neutrófilos do *pool* marginal para a circulação, sem que haja aumento de produção pela medula óssea, como ocorre, por exemplo, após atividade física e também em certos momentos na gestação. É importante ressaltar também que nem toda infecção bacteriana causa neutrofilia; de fato, determinadas infecções bacterianas suprimem a produção de neutrófilos, resultando em neutropenia.

Desvio à esquerda

Frequentemente, na vigência de quadros infecciosos bacterianos, a estimulação do setor granulocítico da medula óssea provoca a liberação de número elevado de neutrófilos jovens no sangue periférico (bastonetes, metamielócitos, mielócitos e, em certas situações, até promielócitos e mieloblastos). Esse fenômeno é denominado desvio à esquerda, pressupondo de forma didática que a linha normal de maturação celular seja representada da esquerda para a direita (Figura 52.1).

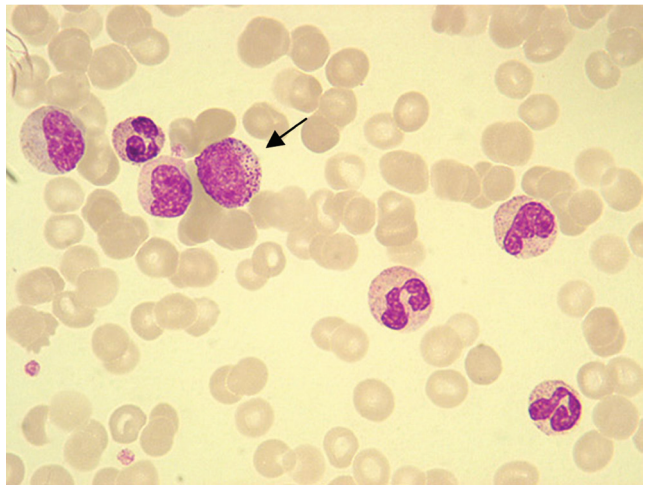


Figura 52.1 Neutrofilia com desvio à esquerda (esfregaço de sangue periférico). Nota-se a presença de precursores granulocíticos, incluindo um promielócito (seta).
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

O desvio à esquerda representa uma das únicas situações em que a avaliação do valor relativo ou percentual dos leucócitos torna-se útil. No entanto, os limites precisos (valores absolutos e relativos) que caracterizam o desvio à esquerda são controversos. Assim, há que se ter muito cuidado com alterações discretas, como, por exemplo, um leve aumento da porcentagem de bastonetes sem a presença de leucocitose, pois frequentemente se trata de uma alteração laboratorial desprovida de relevância clínica. Nesse contexto, a presença de pelo menos 10% de bastonetes ou de formas mais precursoras (metamielócitos, mielócitos etc.) na contagem diferencial de um leucograma que revela leucocitose com neutrofilia muito provavelmente seria acompanhada de condição clínica relevante, que demandaria uma investigação ou acompanhamento específico por parte do médico.

Frequentemente, a intensidade da neutrofilia e do desvio à esquerda guardam correlação com o quadro clínico do paciente. Assim, por exemplo, quadros infecciosos leves provocam leucocitose discreta com poucas formas imaturas de neutrófilos circulantes. Por outro lado, nas infecções graves ou na septicemia, podemos observar neutrofilia intensa com desvio à esquerda acentuado que, por vezes, acompanha-se de alguns mieloblastos circulantes. Outro aspecto importante do desvio à esquerda é que esse geralmente se resolve de forma gradual e paralela à melhora da doença de base, tornando-se, portanto, um parâmetro útil para avaliar a eficácia da terapia instituída.

O desvio à esquerda que acompanha os processos infecciosos é geralmente escalonado, ou seja, sua composição celular no sangue periférico respeita a ordem natural de maturação dos granulócitos, fazendo com que a proporção de células maduras seja maior do que a de células jovens. Quando o desvio à esquerda não respeita a ordem de maturação das células, ele é dito não escalonado. A observação de leuco-

citose com desvio à esquerda escalonado, associado à presença de granulações tóxicas e de corpos de Döhle, refletem granulopoiese neutrofílica acentuada, frequentemente observada nas infecções bacterianas graves. O início do tratamento com resolução do quadro infeccioso geralmente coincide com a melhora da leucocitose e com a diminuição do desvio à esquerda (Tabela 52.2).

Tabela 52.2 Exemplo da evolução de leucocitose com desvio à esquerda em um paciente tratado por processo infeccioso bacteriano.

	Fase aguda		Fase de convalescença	
Leucócitos totais	25.000/mm³	% mm³	15.000/mm³	% mm³
Metamielócitos	5	1.250	0	0
Bastonetes	15	3.750	5	750
Segmentados	64	16.000	65	9.750
Eosinófilos	0	0	2	300
Basófilos	0	0	0	0
Linfócitos	13	3.250	25	3.750
Monócitos	3	750	3	450

Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

Alterações citológicas reacionais dos neutrófilos

As alterações reacionais observadas no citoplasma dos neutrófilos são as alterações qualitativas mais frequentes na prática diária e incluem as granulações tóxicas, os corpos de Döhle, vacuolização e degranulação, entre outras. Nos quadros reacionais, como nas infecções bacterianas, é comum a presença de mais de um tipo de alteração citoplasmática nos neutrófilos presentes em lâmina e, por vezes, na mesma célula. Além disso, nas situações reacionais, o acometimento celular por tais alterações não é uniforme, podendo aparecer em alguns neutrófilos e poupando outros.

- **Granulações tóxicas:** trata-se da persistência de grânulos primários alterados nos neutrófilos, apresentando-se, portanto, maiores e mais basofílicos que os grânulos secundários normalmente presentes nas formas mais diferenciadas (Figura 52.2). Nas infecções bacterianas, a presença de granulações tóxicas em neutrófilos maduros reflete uma aceleração da produção de granulócitos pela medula óssea.
- **Degranulação:** a degranulação é um fenômeno normal de neutrófilos que foram ativados ou agredidos. Nessas condições, os grânulos primários esvaziam seu conteúdo dentro dos fagossomos, enquanto os grânulos secundários são secretados para o meio extracelular. A degranulação está geralmente associada à ruptura da membrana celular no momento da realização do esfregaço.
- **Vacuolização:** vacuolização no citoplasma do neutrófilo representa o produto da fagocitose associado à junção dos grânulos citoplasmáticos. A vacuolização resultante da ingestão de microrganismos é geralmente observada nos quadros infecciosos, principalmente na septicemia de etiologia bacteriana ou fúngica; nessas situações, os vacúolos são grandes, distribuídos de forma irregular no citoplasma e, por vezes, cercados por granulação tóxica (Figura 52.2).
- **Corpos de Döhle:** são agregados de RNA ribossômico ou retículo endoplasmático rugoso que podem ser observados em neutrófilos segmentados e bastonetes. Citologicamente aparecem como pequenas inclusões citoplasmáticas, com 1 a 2 μm de diâmetro, de cor azul-pálido ou acinzentada, isoladas ou múltiplas, dispostas

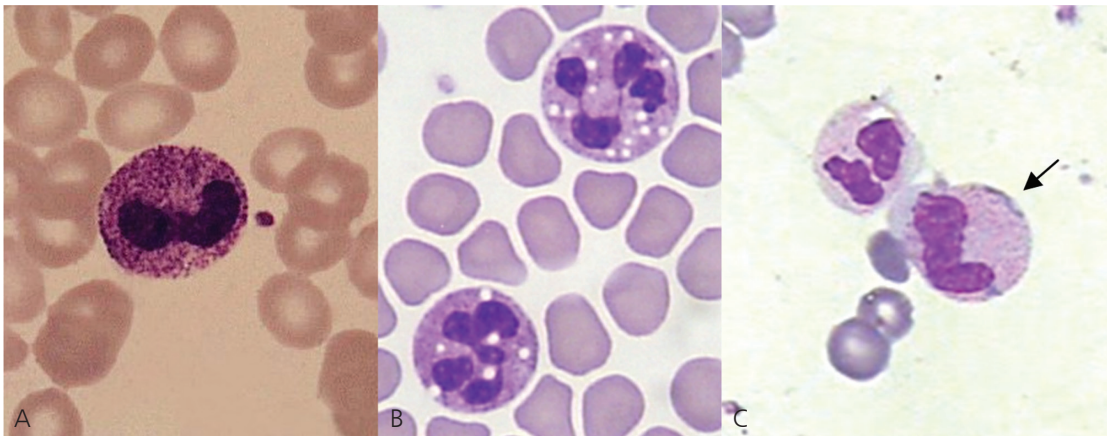


Figura 52.2 Alterações reacionais dos neutrófilos: granulações tóxicas **(A)**, vacuolização **(B)** e corpos de Döhle (**C**; seta).
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

na periferia da célula (Figura 52.2). Os corpos de Döhle são relativamente inespecíficos, podendo estar associados a quadros infecciosos e sépticos, inflamações, gravidez, queimaduras, pós-operatório, entre outros.

Reação leucemoide

Em certas situações, a resposta neutrofílica a processos infecciosos e inflamatórios é tão exacerbada, que a leucometria atinge níveis geralmente observados apenas em processos leucêmicos, acima de 30.000 – 40.000/mm^3, daí o nome de "reação leucemoide". Com frequência, tais reações podem ser acompanhadas de desvio à esquerda de acentuada intensidade, que pode culminar inclusive com aparecimento de alguns mieloblastos nos quadros mais avançados. Por se tratar de condição reacional e benigna, a reação leucemoide é transitória e as alterações exacerbadas normalizam-se gradualmente acompanhando a melhora clínica após a instituição do tratamento. A Figura 52.3 ilustra um caso de reação leucemoide acompanhado pelo autor.

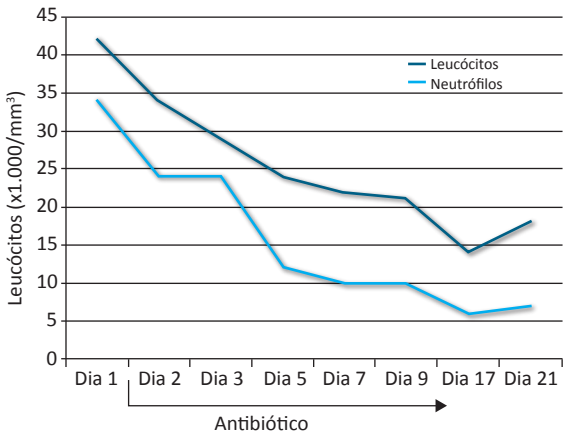


Figura 52.3 Reação leucemoide secundária à erisipela e evolução após o início da antibioticoterapia.
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

Neutropenia nos quadros infecciosos

As infecções (bacterianas, virais ou fúngicas) são causas comuns de neutropenia. Qualquer processo infeccioso no qual o consumo e o recrutamento de neutrófilos sobrepujam a produção medular resultará em neutropenia. Essa situação é frequentemente observada em idosos, crianças e pacientes debilitados com pouca reserva medular. Alguns exemplos de infecções virais caracterizadas por neutropenia são: sarampo, febre amarela, dengue, hepatite viral e mononucleose infecciosa.

Por fim, alguns indivíduos podem desenvolver neutropenia em decorrência do desvio de neutrófilos circulantes para o *pool* marginal. Essa situação pode ocorrer devido a reações de hipersensibilidade, infecções virais ou hipotermia, sendo por isso denominada pseudoneutropenia, uma vez que o *pool* total de granulócitos não está reduzido.

HEMOGRAMA NAS INFECÇÕES VIRAIS

Ao contrário das bactérias, os vírus não têm parede celular, nem atividade metabólica independente, de modo que utilizam células hospedeiras para se replicarem. O interferon é a principal citocina que confere proteção inicial às infecções virais, e os anticorpos são importantes na prevenção da invasão e disseminação dos vírus na corrente sanguínea. Já os linfócitos citotóxicos (CD8) e *natural killer* são os responsáveis pela destruição de células infectadas, impedindo o alastramento dos vírus de uma célula para outra. Dessa forma, a linfocitose com aumento do número de linfócitos atípicos (ou ativados) é um achado frequente nas infecções virais.

Linfocitoses reacionais

Ao longo de uma resposta imune, alguns linfócitos sofrem ativação e alteram a sua morfologia, deixando sua característica de linfócito "típico" (pequeno, com citoplasma escasso e núcleo com cromatina condensada) para assumir a forma de um linfócito "atípico" (maior, com citoplasma abundante e de contornos irregulares, e núcleo com condensação variável de cromatina), conforme mostra a Figura 52.4.

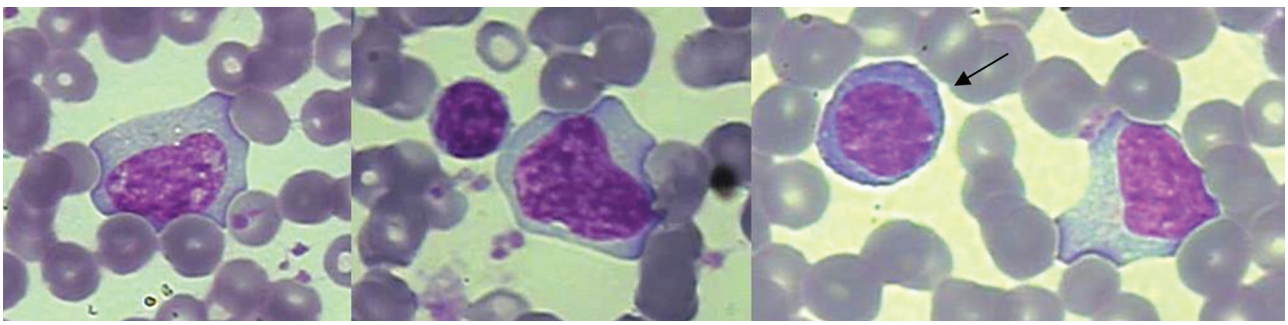


Figura 52.4 Esfregaço de sangue periférico evidenciando quatro linfócitos atípicos, sendo um deles linfoplasmocitoide (seta), e um linfócito típico (ao centro).
Fonte: Instituto Naoum de Hematologia.

Quando observamos linfócitos "típicos", é impossível diferenciá-los em linfócitos B ou T apenas com base na morfologia. Já os linfócitos "atípicos" consistem, em sua maioria, de linfócitos T. Embora popular e consagrado, o termo "atípico" é um tanto quanto inadequado para designar esse tipo de linfócito, pois na verdade tratam-se de linfócitos normais que foram ativados pelo sistema imune. Alguns autores também utilizam a denominação "virócitos" para essas células, o que também não reflete a realidade, uma vez que linfócitos ativados aparecem em outras situações além das infecções virais; talvez os termos mais apropriados sejam linfócitos "ativados" ou "reacionais". Os linfócitos B circulantes, por sua vez, também podem ser ativados pela resposta imune e assumir morfologia "atípica" e intermediária no processo de maturação para plasmócito e, pela sua aparência, são denominados linfócitos linfo-plasmocitoides (células com citoplasma arredondado, de contornos regulares, pouco mais abundante e basofílico que o do linfócito "típico" e núcleo que tende a posicionar-se na periferia da célula) (Figura 52.4).

A maioria das alterações reacionais dos linfócitos resulta da resposta imune a processos infecciosos virais que aumentam o número de linfócitos circulantes e alteram a sua morfologia. Embora classicamente descrita na mononucleose infecciosa, é importante ressaltar que a linfocitose absoluta acompanhada de número elevado de linfócitos atípicos é um achado inespecífico que pode ocorrer em qualquer infecção viral, independente do agente etiológico. Por outro lado, não podemos esquecer que é possível a presença de infecção viral sem linfocitose ou linfócitos atípicos.

A linfocitose é estabelecida quando a contagem absoluta de linfócitos encontra-se acima de 4.000/μL em adultos, e superior a 8.500/μL em crianças. Em geral, as crianças são mais propensas que os adultos tanto em relação à intensidade da linfocitose quanto às alterações morfológicas dos linfócitos, sendo possível a observação de linfócitos atípicos ou ativados em crianças aparentemente saudáveis. Por outro lado, é importante destacar que o relato da presença de linfócitos atípicos ou ativados deve ser feito preferencialmente quando o seu número supera 5% da contagem específica dos leucócitos.

A Tabela 52.3 exibe as principais causas de linfocitose.

Tabela 52.3 Principais causas infecciosas de linfocitose.

Infecções virais
• Mononucleose infecciosa
• Infecção por citomegalovírus
• Ocasionalmente: Hepatites virais, Dengue, Varicela, Rubéola, Adenovírus, Herpes vírus
Linfocitose infecciosa aguda
Infecções bacterianas
• Coqueluche
• Ocasionalmente: tuberculose em recuperação, brucelose, sífilis, doença da arranhadura do gato, febre tifoide, difteria
Infecções por protozoários
• Toxoplasmose
• Ocasionalmente: malária

Fonte: Adaptada do livro Doenças que Alteram os Exames Hematológicos – Naoum FA.

- **Mononucleose infecciosa:** é uma infecção causada pelo vírus Epstein-Barr (VEB), que acomete principalmente adolescentes e adultos jovens. O alvo do VEB é o linfócito B; a infecção deflagra então uma resposta imune com ativação e proliferação dos linfócitos T, que alteram sua morfologia tomando a conformação de linfócitos atípicos, observados no esfregaço de sangue periférico (geralmente acima de 20%). Clinicamente, os principais sintomas são febre, dor de garganta, linfonodomegalia cervical e hepatoesplenomegalia. A infecção tem curso autolimitado, durando cerca de duas semanas.
- **Infecção por citomegalovírus (CMV):** essa doença é muito semelhante à mononucleose infecciosa sob o ponto de vista laboratorial e clínico, embora os sintomas de dor de garganta e a linfonodomegalia não sejam tão comuns. Quando afeta o recém-nascido, pode causar doença de inclusão citomegálica, hepatoesplenomegalia, icterícia, catarata e retardo mental. Os grupos mais suscetíveis a essa infecção são os pacientes imunossuprimidos, os receptores de transplante de medula óssea e os doentes politransfundidos (pela possibilidade de receberem hemocomponentes contaminados com leucócitos infectados pelo CMV).
- **Linfocitose infecciosa aguda:** é uma condição benigna e autolimitada que geralmente acomete crianças até os 10 anos de idade. Não se sabe ao certo a etiologia, que pode ser viral ou não. A maioria dos pacientes é assintomática, e os sintomas, quando presentes, incluem febre, sintomas respiratórios, diarreia e dor abdominal. A principal alteração laboratorial é uma leucocitose acentuada, podendo chegar a 50.000/μL, às custas de linfócitos pequenos ("típicos") com pouca ou nenhuma alteração morfológica resultante da intensa proliferação de linfócitos T. O período de incubação é de 12 a 20 dias e a doença dura de três a cinco semanas.
- **Coqueluche:** nessa doença, causada pela bactéria *Bordetella Pertussis*, o quadro laboratorial caracteriza-se por linfocitose com cerca de 70% a 90% de linfócitos "típicos" com morfologia normal. Embora o achado de linfocitose seja incomum nas infecções bacterianas em crianças com mais de 6 meses de idade, na coqueluche acredita-se que a linfocitose observada resulta da ação da toxina bacteriana sobre a redistribuição dos linfócitos, o que impede a sua migração através do endotélio vascular.
- **Toxoplasmose:** é causada pelo *Toxoplasma gondii* e cursa com manifestações clínicas e laboratoriais semelhantes àquelas que acompanham a mononucleose infecciosa. Entretanto, na toxoplasmose, o comprometimento ganglionar tende a ser generalizado e não restrito às cadeias

cervicais. Não é comum a queixa de dor de garganta ou a presença de esplenomegalia. A linfocitose é geralmente relativa e não absoluta, embora a presença de morfologia reacional e linfócitos atípicos sejam comuns.

Diagnóstico diferencial das linfocitoses

Uma linfocitose falsa ou pseudolinfocitose é frequentemente observada nos distúrbios hemolíticos graves como, por exemplo, nos pacientes portadores de talassemia maior e anemia falciforme. Nesses pacientes, a medula óssea apresenta-se hiperplásica, principalmente no setor eritroide, em virtude da estimulação hematogênica decorrente da hemólise acentuada, o que provoca a liberação de um grande número de eritroblastos no sangue periférico, que são contados como linfócitos nos contadores eletrônicos.

Outra abordagem extremamente importante nas linfocitoses é a diferenciação entre as situações reacionais e as doenças neoplásicas (doenças linfoproliferativas agudas e crônicas). Geralmente, as linfocitoses neoplásicas são persistentes e as populações linfocitárias tendem a ser mais homogêneas, tendendo a um padrão morfológico comum, ao passo que nas linfocitoses reacionais a morfologia é mais variável, além do quadro ser transitório. No entanto, o diagnóstico diferencial nessas situações pode ser extremamente difícil, especialmente nas linfocitoses acentuadas, requerendo interpretação numérica cuidadosa e análise citológica competente, sempre correlacionando os achados laboratoriais com o quadro clínico e a evolução do paciente. A repercussão laboratorial das doenças linfoproliferativas será abordada no capítulo "Diagnóstico das neoplasias hematológicas".

Linfopenia

A definição mais consistente de linfopenia é aquela baseada nos valores absolutos dos linfócitos, pois é mais relevante sob o ponto de vista clínico.

A diminuição do número de linfócitos circulantes pode resultar de baixa produção, redistribuição anormal ou destruição de linfócitos. As principais causas infecciosas de linfopenia estão listadas na Tabela 52.4.

Tabela 52.4 Principais causas infecciosas de linfopenia.

Infecções
• Influenza
• Infecção pelo HIV
• Ocasionalmente: outras infecções virais, tuberculose miliar, pneumonia, malária, septicemia.

Fonte: Adaptada do livro Doenças que Alteram os Exames Hematológicos – Naoum FA.

Um exemplo de linfopenia por alteração na distribuição de linfócitos é aquela resultante da ação de corticosteroides, que fazem os linfócitos ficarem retidos nos órgãos linfoides secundários, bloqueando a sua recirculação. Assim, o aumento da secreção endógena de corticosteroides secundários a processos agudos infecciosos e inflamatórios pode resultar em linfopenia transitória. Na infecção pelo HIV, o mecanismo é a destruição ou morte prematura de linfócitos.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Bain BJ. Células sanguíneas: um guia prático. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p.488.
2. Bain BJ. Diagnosis from the blood smear. N Eng J Med. 2005;353:498-507.
3. Bellanti JA, Kadlec JV, Escobar-Gutiérrez A. Cytokines and the immune response. Pediatr Clin North Am. 1994;41(4):597-621.
4. Failace R. Hemograma: manual de interpretação. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. p.298.
5. Hoffbrand AV, Lewis SM, Tuddenham EG. Postgraduate haematology. 4.ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1999. p.722.
6. Hoffbrand AV, Mehta AB. Haematology at a glance. 2.ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2005. p.117.
7. Howard MR, Hamilton PJ. Haematology: an illustrated colour text. 3.ed. Philadelphia: Elsevier Ltd, 2008. p.124.
8. Janeway CA, Travers P, Walport M, et al. Imunobiologia – o sistema imune na saúde e na doença. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p.824.
9. Klein J, Sato A. Advances in immunology: the HLA system (first of two parts). N Egn J Med. 2000;343(10):702-9.
10. Naoum FA, Naoum PC. Hematologia laboratorial: leucócitos. São José do Rio Preto: Academia de Ciência e Tecnologia, 2006. p.144.
11. Naoum FA. Doenças que alteram os exames hematológicos. São Paulo: Atheneu, 2010. p.220.
12. Parkin J., Cohen B. An overview of the immune system. Lancet. 2001;357:1777-89.
13. Playfair JHL, Lydyard PM. Medical Immunology: made memorable. 2.ed. London: Churchill Livingstone, 2000. p.108.
14. Provan D, Singer CRJ, Baglin T, et al. Oxford handbook of clinical haematology. Oxford: Oxford University Press, 2009. p.820.
15. Spivak JL. The blood in systemic disorders. Lancet. 2000;355:1707-12.
16. Stiene-Martin EA, Lotspeich-Steininger CA, Koepke JA. Clinical hematology: principles, procedures, correlations. 2.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1998. p.817.
17. Verrastro T, Lorenzi TF, Wendel Neto S. Hematologia e hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p.316.
18. Zucker-Franklin D, Grossi CE. Atlas of blood cells – function and pathology. 3.ed. Milano: Edi-ermes, 2003. p.1002.

PARTE

10

Hemostasia

Marcos Kneip Fleury

53

capítulo

Fernando Pretti

Fisiologia da Hemostasia

Não é incomum que alguma vez na vida uma pessoa tenha apresentado um sangramento nasal ou em um pequeno corte na pele. Entretanto, em muitos casos, a hemorragia cessa rapidamente. Esse resultado feliz resulta de uma ação do nosso processo hemostático normal. *Hemostasia* é a interrupção da hemorragia no local da injúria e é um dos mais básicos mecanismos de defesa do organismo. Sem hemostasia nós poderíamos sangrar excessivamente mesmo após um trauma trivial. Em contrapartida, uma formação excessiva de coágulo dentro dos vasos poderia interromper o suprimento de sangue para órgãos vitais. Felizmente, o organismo tem um sistema integrado de controles e equilíbrios que permite manter a fluidez do sangue e interromper rapidamente uma hemorragia. Quando um vaso sanguíneo é lesado, quatro mecanismos maiores operam para controlar o sangramento: 1) mecanismo vascular, 2) mecanismo plaquetário, 3) mecanismo da coagulação, e 4) fibrinólise. Esses quatro mecanismos são essenciais para uma hemostasia normal e funcionam em conjunto, um dependendo do outro. Uma tendência à hemorragia pode resultar de defeito em qualquer um desses mecanismos, e se um ou mais estiverem comprometidos o resultado pode ser uma grave hemorragia.

Para compreender melhor uma tendência à hemorragia, é conveniente dividir a hemostasia em dois estágios separados, um *primário* e outro *secundário*. A *hemostasia primária* ocorre em razão de um tamponamento imediato de um orifício na parede do vaso, mediado por uma combinação da vasoconstricção e da adesão e agregação das plaquetas. A formação de fibrina não é essencial nessa fase. Pacientes com alteração na coagulação, tais como os hemofílicos, por exemplo, têm uma hemostasia primária normal, enquanto aqueles que apresentam trombocitopenia mostram defeito na primeira fase da hemostasia. A hemostasia primária, no entanto, é de um benefício temporário. A hemorragia pode começar novamente, a menos que um tampão plaquetário friável seja reforçado por uma firme malha de fibrina. A *hemostasia secundária* é efetuada pela coagulação sanguínea e concluída pela formação de fibrina, que ajuda a manter o tampão hemostático até a cicatrização completar. No processo de reparação tecidual, o tampão de plaquetas e fibrina é gradualmente reparado pela fibrinólise e substituído por um tecido organizado. A lise prematura do coágulo, por uma fibrinólise acelerada pode também provocar sangramento, o que reforça a importância da fibrinólise na hemostasia.

Por questões didáticas, os mecanismos hemostáticos são comentados separadamente, mas vale a pena ressaltar que os mesmos são intimamente relacionados e inseparáveis.

FASE VASCULAR

O controle imediato de uma hemorragia provocada por uma injúria de um pequeno vaso é efetuado pela vasoconstricção. Artérias e veias pequenas contêm músculo liso, que podem contrair completamente quando elas são lesadas. Os capilares não têm fibras musculares, mas os esfíncteres pré-capilares podem exercer o controle do sangramento. A contração vascular reduz o fluxo através do vaso lesado e pode ser suficiente, pelo menos temporariamente, para interromper o defeito do pequeno vaso. A vasoconstricção é menos efetiva em prevenir perda sanguínea de uma artéria ou veia de maior calibre.

O sistema hemostático apresenta tanto propriedades pró-trombóticas como antitrombóticas, as quais são delicadamente balanceadas para resolver problemas locais e sistêmicos. Sob condições fisiológicas, forças antitrombóticas naturais ultrapassam a tendência trombótica, limitando a agregação plaquetária e a ativação da fibrina, enquanto o tônus muscular é otimizado para manter o fluxo sanguíneo e garantir a função dos órgãos.

Várias substâncias são liberadas ou ativadas no endotélio vascular lesado, ora para evitar a obstrução vascular, ora contribuindo para a oclusão do vaso lesado (Tabela 53.1).

A hemostasia dependente dos vasos e é também influenciada pelo suporte do tecido extravascular. Uma hemorragia na musculatura ou articulação geralmente é limitada pela pressão que o sangue extravascular (hematoma) exerce sobre os pequenos vasos, provocando o colapso dos mesmos. Em contraste, quando a hemorragia é no trato gastrintestinal, o controle fica mais difícil. Algumas patologias hemorrágicas classificadas como púrpuras vasculares são relacionadas na Tabela 53.2.

Tabela 53.1 Fatores produzidos pelo endotélio vascular.

Fatores vasculares antitrombóticos	Fatores vasculares pró-trombóticos
Inibidor da via do fator tecidual	Fator tecidual
Proteína S	Fator de Von Willebrand
Heparina-AT	P-selectina
Proteína C	Inibidor do ativador do plasminogênio
Trombomodulina	Tromboxano A_2
Receptor endotelial da proteína C	Endotelina
Ativador tecidual do plasminogênio	Angiotensina II
Óxido nítrico	
Prostaciclina	

Tabela 53.2 Defeitos vasculares.

Doenças hemorrágicas de causa vascular	
Teleangiectasia hemorrágica hereditária	Púrpura senil
Púrpura de Henoch-Schönlein	Púrpura da infecção
Vasculites	Púrpura do escorbuto
Púrpura do trauma	Púrpura da hipergamaglobulinemia
Púrpura das alterações do tecido conjuntivo	

FASE PLAQUETÁRIA

As plaquetas são pequenas, com o diâmetro de cerca de um terço do das hemácias, arredondadas, anucleares e contêm grânulos pequenos dispersos no seu interior. São produzidas pelos megacariócitos e circulam por aproximadamente 10 dias no sangue. O sangue periférico contém 150 mil a 400 mil plaquetas/mm^3, que circulam sob a forma de discos, não aderem ao endotélio vascular normal nem se agregam.

A membrana externa participa de todas as interações com o ambiente e ocupa, portanto, um papel central na fisiologia plaquetária. Ela é composta de duas camadas de fosfolipídio em que são acopladas glicoproteínas, colesterol e proteínas. Os fosfolipídios da membrana plaquetária são particularmente ricos em ácido aracdônico, o lipídio precursor das prostraglandinas e dos tromboxanos.

A superfície plaquetária apresenta cargas negativas, o que contribui para a repulsão das plaquetas, tendo um papel importante na prevenção da agregação. A mudança das cargas elétricas das plaquetas facilita a agregação.

Na microscopia eletrônica as plaquetas apresentam muitos grânulos (grânulos densos e grânulos α), assim como mitocôndrias. Os *grânulos densos* contêm ADP, ATP, cálcio e serotonina. Os *grânulos* α contêm outras substâncias, como fibrinogênio, fibronectina, fator de von Willebrand, fator V, fator 4 plaquetário (PF 4), β-trombomodulina e fator de crescimento plaquetário. Essas substâncias presentes nos grânulos tem um papel muito importante na função plaquetária. As plaquetas contêm, também, microfilamentos e um anel circunferencial de microtúbulos que estão envolvidos na manutenção da forma das plaquetas e no fenômeno contrátil que ocorre durante a secreção plaquetária e retração do coágulo. O sistema canalicular fechado representa canais tortuosos no citoplasma das plaquetas e podem facilitar o transporte de substâncias para o plasma durante a reação de liberação plaquetária (Figura 53.1).

As plaquetas apresentam, na superfície de sua membrana lipídica, uma série de receptores específicos, na sua maioria glicoproteínas, que reconhece várias substâncias, tais como:

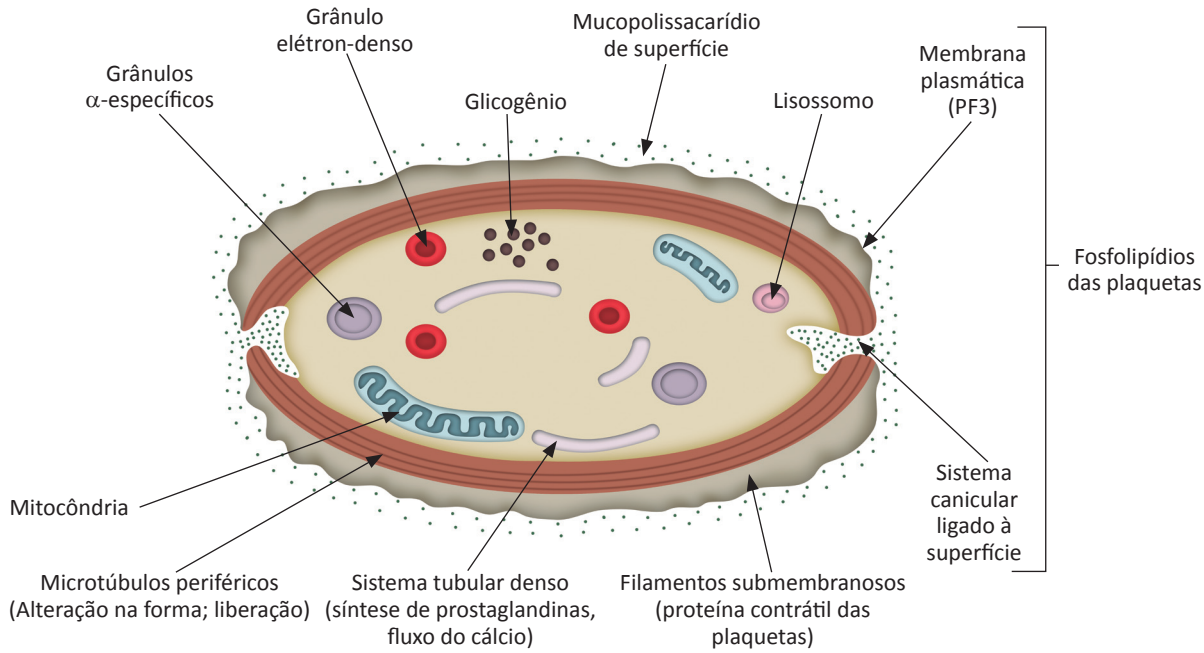


Figura 53.1 Plaqueta: ultraestrutura.
Fonte: A Victor Hoffbrand e Jhon E Pettit. Atlas Colorido de Hematologia Clínica, 3ª Ed. 2000; 268.

fator de von Willebrand (FVW), fibrinogênio, colágeno, fibronectina, trombina, ADP, tromboxane A_2 e outros.

A glicoproteína Ib (GP Ib) está relacionada a várias atividades funcionais diferentes: 1) como um receptor para o fator de von Willebrand quando as plaquetas são estimuladas com ristocetina; 2) como um receptor de trombina; 3) como um receptor de anticorpos dependentes de drogas; e 4) com uma estreita proximidade com o receptor para imunocomplexos.

A deficiência das glicoproteínas IIb (GP IIb) e IIIa está relacionada com a Tromboastenia de Glanzmann.

Um dos mais impressionantes aspectos da fisiologia plaquetária é a habilidade das plaquetas em alterar sua forma de uma maneira dramática e abrupta, de disco para esfera com emissão de pseudópodos. A manutenção da forma de disco em repouso e a explosiva mudança de forma são ambas controladas pelo que chamamos de citoesqueleto plaquetário, composto das proteínas contráteis *actina* e *miosina*. A actina é a mais abundante de todas as proteínas plaquetárias, representando cerca de 20% do total, e é similar mas não idêntica à actina do músculo. A miosina, embora seja análoga à miosina muscular, apresenta uma diferença imunológica. A relação de actina/miosina é maior que no músculo esquelético (100:1 *versus* 6:1).

As plaquetas necessitam de enzimas para sintetizar ácidos graxos e fosfolipídios. Dois diferentes mecanismos enzimáticos para a estimulação de liberação do ácido araquidônico dos fosfolipídios foram demonstrados (fosfolipase A_2 e fosfolipase C). O ácido araquidônico não se encontra presente sob a forma livre na célula em repouso, mas esterificado nos fosfolipídios da membrana celular. Pela estimulação das células endoteliais, plaquetas ou leucócitos, ocorre a expulsão de íons cálcio do sistema tubular denso que irá ativar a fosfolipase C e a fosfolipase A_2. O ácido araquidônico pode ser metabolizado por dois sistemas diferentes: pela via da lipoxigenase ou pela via da cicloxigenase. A lipoxigenase produz nos leucócitos os leucotrienos, que possuem propriedades farmacológicas importantes, tais como quimiotaxia, aumento da permeabilidade e outras funções inflamatórias. A via que nos interessa é aquela relacionada com a *cicloxigenase*, que é a via mais importante na metabolização do ácido araquidônico na plaqueta e nas células endoteliais. A partir da ação da cicloxigenase é produzida a *prostaglandina* G_2, que sob a ação de uma peroxidase transforma-se em *prostaglandina* H_2. Essas duas prostaglandinas são intermediárias que se formam na síntese das prostaglandinas e são denominadas *endoperóxidos cíclicos* – substâncias extremamente instáveis. As vias posteriores de metabolização das prostaglandinas dependem do tecido no qual elas se encontram. Na plaqueta, sob efeito da enzima *tromboxano-sintetase*, forma-se o *tromboxano* A_2, que, espontaneamente, se transforma em *tromboxano* B_2 desprovido de qualquer atividade biológica. O tromboxano A_2 é um potente agente indutor de agregação plaquetária e potente vasoconstrictor, possui meia vida biológica de 30 segundos e é produzido principalmente pelas plaquetas. Nas células endoteliais da parede vascular, os endoperóxidos cíclicos (prostaglandinas), pela ação da *prostaciclina sintetase*, são transformados em *prostaciclina* (PGI_2). A prostaciclina impede a agregação das plaquetas e é um vasodilatador. É bastante lábil e após cerca de 120 segundos se degrada espontaneamente em um derivado inativo.

Os endoperóxidos cíclicos encontram-se numa posição central no metabolismo do ácido araquidônico. Dependendo do tecido, diferentes metabólitos exercendo efeitos antagonistas podem ser formados: o tromboxano A_2 (TXA_2), de ação agregante, ou a prostaciclina (PGI_2), antiagregante.

A prostaciclina atuando sobre a membrana plaquetária estimula a enzima *adenilciclase*, que possui a propriedade de transformar o ATP em AMP cíclico (AMPc), o qual irá desencadear a fosforilação de uma proteína fixadora de cálcio. Dessa maneira, os íons cálcio, livres, podem ser novamente fixados às estruturas da membrana, provavelmente no sistema tubular denso. Quando não existir mais íons cálcio livres, as plaquetas desagregam-se. As células endoteliais sintetizam a prostaciclina a partir de seu próprio araquidônico, ou, então, elas subutilizam os endoperóxidos cíclicos formados pelas plaquetas. A importância fisiológica dessa reação é facilmente compreendida: o agregado plaquetário serve para obstruir uma lesão local num vaso danificado. Ocorrendo uma propagação do agregado para além dos limites lesados do vaso, as células endoteliais normais imediatamente transformam os endoperóxidos cíclicos, formados pelas plaquetas ativadas durante a formação do agregado plaquetário, em prostaciclina. Ela atuará sobre as plaquetas para que retomem a sua forma discoide, de maneira que o agregado seja desfeito. Dessa forma, elas podem retomar a corrente sanguínea, de sorte que não se forme nenhum trombo na parte normal do vaso (Figura 53.2).

Na circulação sanguínea normal, a camada de sangue contígua à parede vascular é isenta de células porque os elementos figurados do sangue apresentam tendência a se deslocar no centro da corrente.

As células endoteliais funcionalmente normais impedem a adesão de plaquetas através de muitos processos ativos. As células endoteliais produzem uma série de proteínas, bem como a *prostaglandina* I_2 (prostaciclina ou PGI_2), que é inibidora da agregação plaquetária e vasodilatadora. A produção localizada de prostaciclina aumenta quando plaquetas ativadas entram em contato com o endotélio normal. Essa produção é interrompida toda vez que a célula endotelial for lesada, permitindo a adesão de plaquetas às bordas da lesão. No local onde o endotélio permanece íntegro, a produção de prostaciclina se dá normalmente, impedindo que o tampão hemostático se propague além dos limites da lesão.

Quando ocorre o desprendimento do endotélio, as plaquetas entram em contato direto com as estruturas subendoteliais expostas, por exemplo, as fibras de colágeno presentes na membrana basal e microfibrilas. A adesão das plaquetas às microfibrilas necessita de uma proteína que faz parte do complexo do fator VIII, designada *fator de von Willebrand* (FVW). Esse fator faz a interação entre as microfibrilas e as glicoproteínas específicas presentes na membrana das plaquetas (receptores), o que permite a rápida adesão de plaquetas à parede vascular lesada.

A invenção do agregômetro permitiu uma quantificação simples da agregação plaquetária com razoável precisão

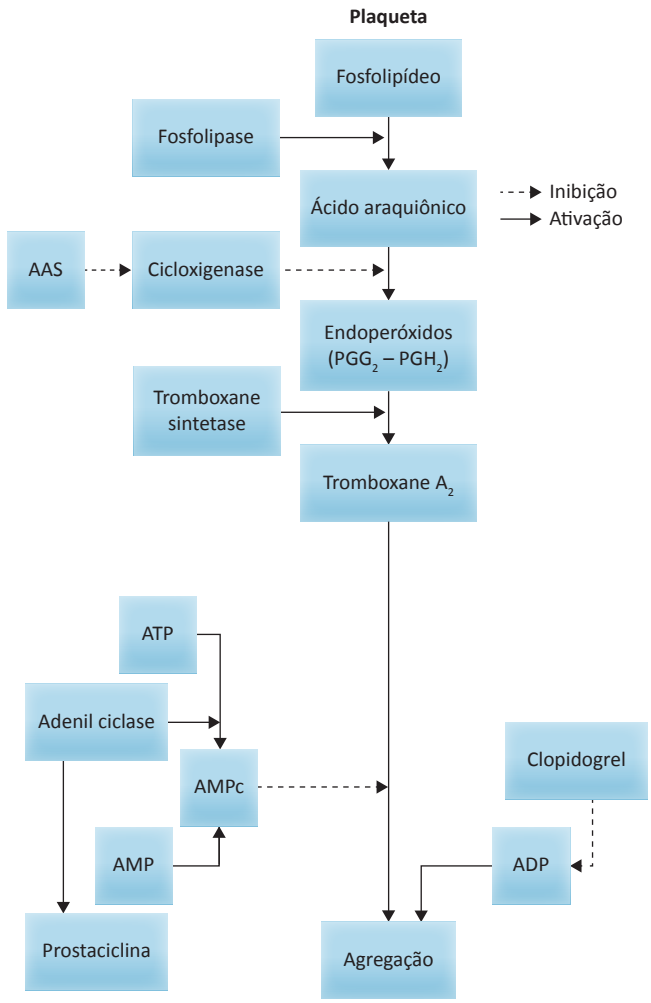


Figura 53.2 Bioquímica plaquetária.

quando uma atenção adequada é dada à parte técnica. A mudança de forma da plaqueta é a primeira alteração observada após a adição do ADP.

A forma discoide das plaquetas é desfavorável ao contato recíproco e ao desenvolvimento de força de coesão suficiente para induzir a agregação entre as plaquetas. O ADP, liberado pelas hemácias e plaquetas ativadas, o colágeno subendotelial e a trombina são três substâncias que transformam a plaqueta da forma discoide para esferoidal com formação de pseudópodos, motivo pelo qual tais substâncias são denominadas *indutores da agregação*. Essas substâncias atuam sobre receptores específicos da membrana plaquetária, com liberação dos íons cálcio do sistema tubular denso. O cálcio na presença de uma proteíno-quinase fosforila a cadeia leve da *miosina*, que sob essa forma se liga à *actina*. Em presença de concentrações crescentes de cálcio, formam-se fibras de actina que irão induzir a contração centrípeta do anel de microtúbulos situado sob a membrana. Com isso, a membrana da plaqueta não se encontra distendida e a célula se transforma, adquirindo uma

forma bizarra, rica em prolongamentos (pseudópodos) que irão assegurar o contato celular mais sólido entre as plaquetas, que se interpenetram por meio de seus prolongamentos.

O agente agregante ADP libera um receptor específico na membrana da plaqueta para o fibrinogênio, o qual é um cofator essencial para a agregação. A estrutura simétrica do fibrinogênio sugere que a sua função estaria no estabelecimento de ligações entre as plaquetas.

A agregação primária induzida pelo ADP é sempre reversível. A plaqueta ativada pode soltar-se, retomar a sua forma discoide e perder toda a sua afinidade pelas demais plaquetas, de maneira que o agregado possa desfazer-se espontaneamente. Para essa desativação, é necessário que os íons cálcio, que estavam livres no citoplasma, sejam novamente armazenados, mecanismo dependente da prostaciclina.

A retomada da plaqueta à sua forma discoide dependerá da intensidade da estimulação exercida pelo agente indutor. Se a estimulação for de intensidade e duração suficientes, uma grande quantidade de íons cálcio será liberada do sistema tubular denso. Esses íons ativarão a *fosfolipase* que desencadeará a liberação do *ácido araquidônico*, o qual se transformará em tromboxane A_2 na plaqueta. O tromboxane A_2 pode, além disso, provocar quase imediatamente a secreção do conteúdo dos grânulos intraplaquetários. A *trombina* estimula de maneira tão acentuada a agregação que as fases primária (reversível) e secundária (irreversível) não podem ser discernidas e as plaquetas formam uma massa na qual não é mais possível distinguir os seus contornos (fusão de plaquetas): nesse estágio o fenômeno atinge a irreversibilidade.

O tromboxane A_2 não é responsável pela ativação inicial das plaquetas, mas, sim, pelo resultado dessa ativação; com o ADP presente no interior da plaqueta, o tromboxane A_2 é o corresponsável pelo crescimento posterior do tampão hemostático. Nesse sentido, o ADP e o tromboxano A_2 podem ser considerados mensageiros químicos da plaqueta. Existe um mecanismo de retroalimentação positivo: ativação das plaquetas – síntese de tromboxane A_2 – nova ativação de plaquetas – nova síntese de tromboxane A_2 etc. Essa agregação secundária é irreversível.

No fenômeno de contração e descontração da plaqueta, observa-se que a alteração morfológica da plaqueta é necessária, porém não suficiente. O cálcio extracelular, bem como glicoproteínas específicas (glicoproteína IIb e IIIa), também deve estar presente na face externa da membrana plaquetária. Já foi demonstrado que essas glicoproteínas (receptores) formam juntas um complexo na membrana. Essas moléculas proteicas contêm um agrupamento de hidrato de carbono que se encontra ancorado na membrana e fazem protrusão para o exterior como se fossem os galhos de uma árvore. Dentre outras funções, esses resíduos servem para a fixação do fibrinogênio.

Na reação de liberação, durante a alteração de forma, os grânulos deslocam-se para o centro da célula e mantêm-se próximos entre si. Se a estimulação pelo agente indutor for de tal intensidade, a agregação torna-se irreversível; no caso de o agente ser o tromboxane A_2 ou a trombina, ocorrerá a liberação para o exterior de substâncias acumuladas nos grânulos, fenômeno que recebe o nome de "*reação de liberação*". Nessa reação, grande quantidade de íons cálcio é liberada para o citoplasma. As membranas dos grânulos e do sistema tubular aberto fundem-se de maneira que o conteúdo dos grânulos é impelido para esse sistema conectado à superfície, liberando-se para o meio extracelular. Pesquisas mostram que o conteúdo dos grânulos α é liberado em primeiro lugar e depois o conteúdo dos grânulos densos.

COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

A formação de trombina ocupa uma posição central na coagulação do sangue. Uma vez que essa enzima é formada em concentração suficiente, ela irá imediatamente transformar o fibrinogênio em um gel de fibrina. Além disso, a trombina também está envolvida na agregação plaquetária e na liberação de seus constituintes, bem como na ativação dos fatores V, X, VII e XIII.

O efeito da trombina sobre o fibrinogênio é relativamente simples. A ativação da trombina a partir da protrombina é mais complexa, uma vez que a formação da enzima *protrombinase* (fator Xa) é um processo que envolve vários fatores, que se ativam em etapas sucessivas porque os fatores da coagulação estão normalmente presentes sob a forma inativa. A interação entre os vários fatores ocorre sobre uma superfície de fosfolipídios de carga negativa.

Essa é uma condição necessária porque a interação dos fatores da coagulação, quando em fase líquida, desenvolve-se lentamente em razão de sua baixa concentração e também porque as enzimas ativadas podem ser neutralizadas pelos inibidores que se encontram no plasma. Com a adsorção, as enzimas se encontram em concentrações estequiométricas ideais para a sua interação que, também, será facilitada pela não fixação dos inibidores presentes no plasma à superfície fosfolipídica.

A maioria das etapas de ativação da coagulação está ligada à proteólise limitada. Um por um os fatores da coagulação são ativados e, sob a forma ativada, requerem outro fator da coagulação como substrato específico para a sua atividade, permitindo a ativação do fator seguinte (ativação em cascata). Em sua grande maioria, os fatores da coagulação são serino-proteases (com exceção dos fatores VIIa e XIIIa). Já os fatores VIIIa e Va não possuem atividade catalítica, mas funcionam como proteínas reguladoras da velocidade de ativação. Alguns dos fatores da coagulação, quando sob a forma ativada, tornam-se tão lábeis que desaparecem durante a coagulação (são os fatores substratos: II, VIII, V e fibrinogênio). Outros componentes da coagulação permanecem estáveis após a ativação e podem ser encontrados no soro (são os fatores séricos estáveis).

A tradição e a esquematização didática querem que uma distinção seja feita entre as vias de ativação *intrínseca* e *extrínseca*. Na via intrínseca todos os fatores necessários estão presentes no sangue circulante e a reação é desencadeada pelo contato do sangue com uma superfície carregada negativa-

mente (p. ex.: o colágeno subendotelial) ou então uma superfície estranha (p. ex.: a parede de vidro de um tubo de ensaio). Na ativação extrínseca, o fator de coagulação está presente nos líquidos provenientes dos tecidos lesados, e não no sangue circulante que desencadeia a reação inicial. Secundariamente a uma lesão vascular, esse fator tecidual, denominado *tromboplastina tecidual* (fator III), mistura-se com o sangue e induz a coagulação. A partir da ativação do fator X, as duas vias apresentam-se comuns.

MECANISMO INTRÍNSECO DA COAGULAÇÃO

Algumas proteínas da coagulação são prontamente adsorvidas em superfícies carregadas negativamente, como o colágeno e a membrana basal: são os *fatores XII, XI, o cininogênio de alto peso molecular e a pré-calicreína*. No plasma o cininogênio de alto peso molecular se associa reversivelmente com a pré-calicreína e o fator XI mostrando uma maior afinidade para o último. Quando o *fator XII* entra em contato com uma superfície carregada negativamente, será adsorvido e sofrerá uma alteração conformacional, tornando a molécula muito mais sensível à degradação proteolítica, por exemplo, pela calicreína e plasmina. O complexo circulante pré-calicreína-cininogênio de alto peso molecular é também adsorvido sobre superfícies que possuem cargas negativas porque o cininogênio possui uma região rica em histidina, que possui carga positiva. Uma ativação recíproca ocorre entre a porção livre da calicreína nesse complexo e o fator XII adsorvido. O resultado dessa interação é a ativação do fator XII e a formação da calicreína, a qual irá liberar a *bradicinina* do cininogênio de alto peso molecular. O papel do cininogênio de alto peso molecular seria o de transporte de moléculas (pré-calicreína e fator XI) que são imobilizadas sobre uma superfície de carga negativa e dispostas próximas aos demais fatores de coagulação. Dessa forma, os fatores XIIa e XI estão dispostos em uma relação química bastante próxima. O *fator XIIa* ativa o *fator XI* que, ao contrário da calicreína, permanece firmemente ligado à superfície. Enquanto o processo da coagulação continua, a calicreína difunde-se e irá ativar os sistemas das cininas, fibrinolítico e também do complemento.

A proteólise recíproca envolvendo o fator XII e a pré-calicreína é de grande importância na ativação da *fase contato*, mas ainda não se conhece o que desencadeia a reação inicial. A hipótese mais aceita é a de que o fator XII, bem como a pré-calicreína, possui baixa atividade enzimática, a qual somente aparece quando essas moléculas são colocadas próximas, o que pode ocorrer sobre uma superfície com carga negativa.

O *fator XIa* ativa o *fator IX* (fator anti-hemofílico B), dependente da vitamina K, fixa o *cálcio* (fator IV) graças ao resíduo de ácido γ-carboxiglutâmico, e assim permanece fixo à superfície de micelas de fosfolipídios. O *fator VIII* liga-se diretamente sobre a superfície de fosfolipídios, mesmo na ausência de íons cálcio. O *fator IX* pode ativar o *fator X*, mas tal ativação é feita muito mais rapidamente na presença do *fator VIII*, considerado um cofator não enzimático. Uma aceleração adicional dessa reação ocorre quando o *fator VII* é ativado pelo fator *Xa* ou pela trombina. Existem evidências de que o complexo *fator IXa – fator VIIIa – fosfolipídio* é a unidade catalítica na ativação do *fator X*; a incorporação do *fator IXa* nesse complexo enzimático é acelerada na presença do *fator VIII ativado* (VIIIa).

A interação entre os *fatores IX* e *VIII* desenvolve-se lentamente quando estão livres em solução; entretanto, assim que as moléculas de trombina estimulam as plaquetas, expondo a sua superfície fosfolipídica, essa interação desenvolve-se muito mais rapidamente. A partir do *fator X*, a ativação dos dois sistemas intrínseco e extrínseco da coagulação desenvolve-se por uma via única – o mecanismo comum da coagulação.

MECANISMO EXTRÍNSECO DA COAGULAÇÃO

Somente dois fatores da coagulação participam efetivamente na ativação do *fator X*. Um deles é uma lipoproteína de origem tecidual e tanto o componente proteico como o lipídico são necessários, e é denominado *fator tecidual* (ou *tromboplastina tecidual* ou *fator III*); o outro fator é uma glicoproteína cuja síntese depende da vitamina K: é o *fator VII*, presente no sangue circulante. Quando o *fator tecidual* entra em contato com o sangue, o *fator VII* na presença do *cálcio* (*fator IV*) fixa-se através de seu resíduo do ácido γ-carboxiglutâmico ao componente fosfolipídico do *fator tecidual*. Mesmo sob a forma não ativada, o *fator VII* pode ativar lentamente a molécula do *fator X*, ligado aos fosfolipídios: na presença de moléculas do *fator Xa* essa ativação se passa muito mais rapidamente (mecanismo de retroalimentação positiva), pois o *fator Xa* converte o *fator VII* em *fator VIIa*.

Uma vez que o *fator VIIa,* ligado através do cálcio ao *fator tecidual* (fator III) também ativa o *fator IX*, as duas vias de ativação da coagulação influenciam-se mutuamente.

MECANISMO COMUM DA COAGULAÇÃO

A via comum começa a partir do *fator Xa*, um fator dependente da vitamina K. A ativação dessa proteína é feita na coagulação intrínseca sobre uma superfície fosfolipídica, particularmente sobre a superfície de plaquetas ativadas pela trombina. Na coagulação extrínseca é o componente lipídico da *lipoproteína* do tecido que serve de suporte. O *fator V* da coagulação fixa-se solidamente por meio de ligações hidrofóbicas aos fosfolipídios e, junto com o *fator Xa* e íons *cálcio*, atua como cofator não enzimático para a rápida formação da *protrombinase*, que transformará diretamente a *protrombina* (*fator II)* em *trombina*. Nessa etapa também existe um mecanismo de retroalimentação positiva, pois a trombina modifica o *fator V* acelerando muito a reação. Vale notar que o *fator V* se encontra normalmente presente na membrana da plaqueta.

O *fator Xa* pode quebrar a molécula da protrombina em dois locais, reação que pode ocorrer assim que as substâncias se encontrem livres em solução, mas que se produzirá de maneira muito mais eficiente na presença do *fator V* ligado à superfície de fosfolipídios.

A *protrombina* (fator II) é uma proteína dependente de vitamina K e que por meio de íons *cálcio* fixa-se aos resíduos do ácido γ-carboxiglutâmico às superfícies fosfolipídicas.

Desde que a *trombina* se encontre livre e disponível, ela atua sobre o fibrinogênio, molécula composta de três pares de cadeias polipeptídicas. A trombina quebra uma ligação entre arginina-glicina na extremidade aminada de cada uma das cadeias α e cada uma das duas cadeias β, de maneira que cada molécula libera dois *fibrinopeptídeos* α *e dois fibrinopeptídeos* β. *O monômero de fibrina* restante se fixa firmemente pelas extremidades (após a separação dos fibrinopeptídeos α) e lado a lado (após separação dos fibrinopeptídeos β). Isso se torna possível graças à separação dos fibrinopeptídeos que expõe superfícies que podem agora reagir com superfícies complementares de outros *monômeros de fibrina* por ligações hidrofóbicas e/ou pontes salinas e/ou pontes de hidrogênio. Esses monômeros de fibrina ligados são denominados polímeros, são ainda solúveis (fibrina instável) e precipitam, a menos que eles se tornem grandes. A precipitação dessa fibrina constitui-se no gel de fibrina que forma o esqueleto do trombo.

O *fator XIII* mais o *cálcio* determinam o aparecimento de ligações covalentes entre os monômeros de fibrina que precipitam. Em consequência dessas ligações covalentes o polímero de fibrina torna-se mais sólido e menos sensível à ação trombolítica da plasmina (fibrina estável).

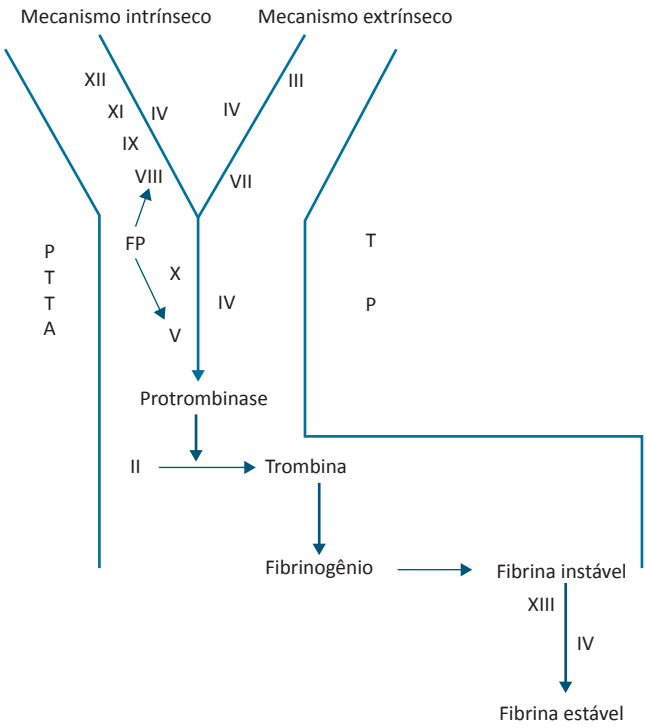


Figura 53.3 Cascata da coagulação.

PTTA: Tempo de tromboplastina parcial ativada. FL: fosfolipídeo.

Fonte: Arquivo Livro Hemostasia SBAC. Cascata da coagulação.

INIBIDORES NATURAIS DA COAGULAÇÃO

A principal função fisiológica da coagulação sanguínea é contribuir para obstruir a lesão de um vaso sanguíneo. Uma vez atingido esse objetivo, deverá existir um mecanismo que previna a formação incontrolada de novas fibras de fibrina. Se esse mecanismo regulador não funcionar, existe o perigo de trombose.

O organismo dispõe de mecanismos fisiológicos para proteger-se de certos fatores ativados da coagulação. Nesse particular, existe uma glicoproteína plasmática, fabricada no fígado, denominada *antitrombina III*. Fisiologicamente, essa proteína é a mais importante. Além de sua ação sobre a trombina, ela inibe outras proteases, tais como os fatores Xa, IXa, XIIa e a calicreína. A antitrombina III fixa-se à trombina de uma forma lenta, porém a sua velocidade pode ser acelerada em cerca de mil vezes na presença da heparina. No homem, a heparina presente no sangue circulante é bastante baixa, porém as células endoteliais contêm o sulfato de heparan, uma substância bastante semelhante à heparina e que possui a propriedade de acelerar de forma bastante acentuada a interação trombina-antitrombina III. Indivíduos que apresentam taxas diminuídas de antitrombina III são predispostos a apresentar trombose.

A proteína C representa outro mecanismo fisiológico de defesa contra a formação incontrolada de fibrina. É uma proenzima cuja síntese hepática depende da vitamina K e é ativada pela trombina e pela trombomodulina, presente nas células endoteliais. A proteína C ativada por esse processo inativa os fatores V e VIII da coagulação. Esses fatores determinam a velocidade de formação da trombina, daí a relevância da proteína C. Outra proteína com participação importante no processo de inibição da coagulação é a *proteína S*, sintetizada no fígado e também dependente da vitamina K. A proteína S atua como cofator da proteína C, acelerando a inativação dos fatores V e VIII. Os pacientes com deficiência de proteína C e proteína S são mais propensos à trombose.

Existem outros inibidores fisiológicos da coagulação, como a α_2 macroglobulina, C_1 inibidor e a α_1 antitripsina, mas com uma participação pouco importante quando comparados à antitrombina III, proteína C e a proteína S.

FIBRINÓLISE

O sistema fibrinolítico compreende três componentes: a proenzima *plasminogênio*, que sofre ativação transformando-se em plasmina; *ativadores do plasminogênio*, os quais podem ter diferentes origens: ativador sanguíneo, ativador endotelial, ativador dos tecidos ou ativador intrínseco do plasminogênio; e *inibidores*, os quais rapidamente neutralizam a plasmina ou interferem na atividade do plasminogênio.

A ativação do *plasminogênio* pode ocorrer por diferentes vias: a *via intrínseca ou humoral*, na qual todos os componentes envolvidos estão presentes na forma de precursor no sangue, uma *via extrínseca* na qual o ativador se origina dos tecidos ou da parede vascular, e é liberado no sangue através de estí-

mulos ou trauma, e uma *via exógena* na qual a substância ativadora, *estreptoquinase* ou *uroquinase*, são infundidas com fins terapêuticos.

A ativação intrínseca do plasminogênio ocorre pelo fator XII, pré-calicreína, cininogênio de alto peso molecular e possivelmente outros componentes. O mecanismo exato para essa ativação, assim como sua importância biológica, ainda não é bem conhecido. A calicreína é capaz de ativar o plasminogênio diretamente, originando a plasmina.

A ativação extrínseca do plasminogênio é feita através dos ativadores do plasminogênio que se encontram nos vários órgãos, tecidos e secreções. Esses ativadores parecem ser serino-proteases e têm sido parcialmente purificados a partir de perfusão vascular *post-mortem*, e também do sangue após exercícios físicos. Um ativador do plasminogênio do tecido, sob a forma altamente purificada, foi isolado e caracterizado a partir do coração de suíno, útero humano e do sobrenadante de cultura de diferentes tecidos humanos. É bem provável que o ativador do plasminogênio encontrado no sangue represente o ativador do plasminogênio de origem vascular. Existe uma identidade desse ativador com o ativador de origem tecidual, porém ambos diferem da uroquinase. Uma propriedade importante do ativador do plasminogênio de origem vaso/sangue é a sua alta afinidade pela *fibrina*.

O ativador exógeno do plasminogênio é representado pela *uroquinase* e *estreptoquinase*. A uroquinase é uma proteinase do tipo tripsina, a qual foi isolada da urina humana ou de cultura de células renais de embrião. A uroquinase difere do ativador do plasminogênio de origem vascular tanto em suas características antigênicas como em sua especificidade enzimática, particularmente no que diz respeito à ativação da fibrina associada ao plasminogênio. A *estreptoquinase* é um produto não enzimático produzido pelos estreptococos que forma um complexo estequiométrico de 1:1 com o plasminogênio ou plasmina, convertendo tanto a proenzima como a enzima em um eficiente ativador do plasminogênio.

O plasminogênio é uma β-globulina que em sua forma inativa tem na sua porção aminoterminal o ácido glutâmico (glu-plasminogênio). Esse plasminogênio é convertido através de digestão limitada pela plasmina em plasminogênio que possui em sua porção aminoterminal o aminoácido lisina, valina ou metionina, passando a receber a designação de "lys-plasminogênio", que tem meia vida plasmática de 0,8 dia. Essa forma de plasminogênio é transformada em plasmina pela quebra de uma única ligação arginina-valina. A plasmina compõe-se de duas cadeias, uma cadeia pesada ou cadeia *A*, e uma cadeia leve ou cadeia *B*, que contem o sítio ativo. As duas cadeias são mantidas juntas por meio de pontes dissulfeto. A forma "lys-plasminogênio" apresenta uma maior afinidade pela fibrina, sendo muito mais rapidamente ativada pela uroquinase do que o "glu-plasminogênio".

A inibição do sistema fibrinolítico pode ocorrer sobre a *plasmina* ou no nível do *ativador do plasminogênio* (PA). Há mais de uma década, a α_2*-antiplasmina* foi identificada como a principal inibidora da plasmina. A α_2*-macroglobulina* atua como um inibidor muito fraco da plasmina e, por isso, é dada pouca importância, nos dias de hoje, para seu papel como um regulador da fibrinólise. A inibição fisiológica do *ativador tecidual do plasminogênio* (t-PA) e do *ativador do plasminogênio tipo uroquinase* (u-PA), no plasma humano, ocorre primariamente pelo *inibidor do ativador do plasminogênio 1* (PAI-1) e pelo *inibidor do ativador do plasminogênio 2* (PAI-2).

A α_2*-antiplasmina* pertence à família dos inibidores chamados de serino-protease. A α_2-antiplasmina, semelhantemente a outros inibidores de proteases do plasma, tem um amplo espectro de inibição, mas seu papel fisiológico como inibidor de outras proteinases é desprezível. A α_2-antiplasmina reage rapidamente com a plasmina, ligando-se à fibrina quando o sangue coagula em presença do cálcio e do fator XIII ativado.

O PAI-1 é um inibidor primário do ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) e do ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA) no plasma humano. As plaquetas contêm uma quantidade significante de PAI-1, que é liberado durante a reação de liberação plaquetária, resultando num aumento de atividade de duas a cinco vezes à do PAI-1. Essa alta concentração de PAI-1 no local pode contribuir para a resistência do plasma rico em plaquetas à lise do coágulo.

O PAI-1 está presente no plasma e é derivado de várias fontes, incluindo células endoteliais, tecido adiposo, fígado e plaquetas.

O PAI-2 foi primeiramente demonstrado no extrato de placenta, sendo localizado no epitélio do trofoblasto. Alta concentração de PAI-2 pode ser encontrada no plasma durante a gravidez, mas também pode ser identificada no homem e em mulheres não grávidas. O PAI-2 foi identificado em leucócitos humanos, e também é secretado pelos monócitos, macrófagos e células do linfossarcoma.

Durante a formação do tampão hemostático ou a digestão do trombo, produtos originados da degradação da fibrina são liberados na circulação e são chamados de D-dímero e são distintos daqueles originados da degradação do fibrinogênio, chamados de PDF (Figura 53.4).

Quando a formação do tampão hemostático apresenta algum defeito (p. ex.: na hemofilia), ocorrendo a fibrinólise fisiológica, pode agravar-se o sangramento e o uso de antifibrinolíticos pode ajudar na hemostasia.

O completo equilíbrio envolvendo o endotélio, as plaquetas, os fatores da coagulação, os inibidores naturais da coagulação e a fibrinólise serve para promover o balanço correto entre a hemostasia no local da injúria e a recuperação do vaso sanguíneo. Qualquer defeito desse intrincado mecanismo pode provocar um desequilíbrio, resultando num quadro de hemorragia ou de trombose.

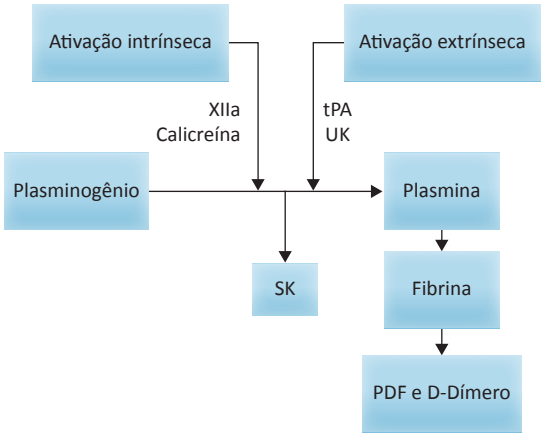


Figura 53.4 Sistema fibrinolítico.
SK: estreptoquinase; tPA: ativador do plasminogênio tecidual; PDF: produtos de degradação da fibrina.
Fonte: Modificada de de A Victor Hoffbrand e Jhon E Pettit. Atlas Colorido de Hematologia Clínica, 3ª Ed. 2000; 296.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Fritsma G. Normal hemostasis and Coagulation. In: Rodak BF. Philadelphia: Saunders, 2002. p.609-26.
2. Griffin JH. Control of Coagulation Reactions. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, et al. 8.ed. New York: MacGraw-Hill, 2010. p.1845-61.
3. Hajjar KA, Marcus AJ, Muller WA. Vascular Function in Hemostasis. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, et al. 8.ed. New York: MacGraw-Hill, 2010. p.1863-81.
4. Monroe DM III, Maureane H, Roberts HR. Molecular Biology and Biochemistry og the Coagulation Factors and Pathways of Hemostasis. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, et al. 8.ed. New York: MacGraw-Hill, 2010. p.1815-43.
5. Morelli VM, Lourenço DM. Fisiologia da Hemostasia. In: Figueiredo MS, Kerbauy J, Lourenço DM. Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar da Unifesp – EPM. São Paulo: Manole, 2011. p.239-48.
6. Morelli VM. Estrutura e Funções das Células Endoteliais e das Plaquetas. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Tratado de Hematologia. São Paulo: Atheneu, 2013. p.571-6.
7. Ratnoff O. The Evolution of Knowledge About Hemostasis. In: Ratnoff O, Forbes C. Londres: Grune & Stratton, 1984. p.1-21.
8. Rezende SM. Fisiologia da Coagulação, Fibrinólise e Controle da Coagulação. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Tratado de Hematologia. São Paulo: Atheneu, 2013. p.577-82.
9. Saito H. Normal Hemostatic Mechanisms. In: Ratnoff O, Forbes C. Londres: Grune & Stratton, 1984. p.23-42.
10. Smyth SS, Whiteheart S, Italiano JE, et al. Platelet Morphology, Biochemistry and Function. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, et al. 8.ed. New York: MacGraw-Hill, 2010. p.1735-89.
11. White GC II, Marder VJ, Schulman S, et al. Overview of Basic Coagulation and Fibrinolysis. In: Marder VJ, Aird WC, Bennett JS, et al. 6.ed. Phyladelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p.103-9.

54

capítulo

Fernando Pretti

Fatores da Coagulação

FATOR I – FIBRINOGÊNIO

O fibrinogênio é uma glicoproteína produzida pelo hepatócito, com peso molecular de 340.000 daltons e meia-vida de 72 a 120 horas. Ele é formado por uma sequência de aminoácidos que constituem 3 pares de cadeias polipeptídicas diferentes, denominadas: $A\alpha_2$, $B\beta_2$ e γ_2.

Durante a transformação do fibrinogênio em fibrina, pela ação da trombina, ocorrem três processos fundamentais na molécula dessa proteína:

1. A liberação dos fibrinopeptídios A e B das cadeias Aα e Bβ para a conversão do fibrinogênio em monômero de fibrina. Os monômeros de fibrina é que vão dar origem à fibrina.
2. A polimerização dos monômeros de fibrina para formar a malha de fibrina.
3. A estabilização da fibrina, por meio de enlaces covalentes por ação do fator XIII.

O fibrinogênio tem uma participação central na hemostasia, consequentemente a ausência de fibrinogênio ou uma alteração na sua função podem determinar defeitos na coagulação sanguínea. Podem ocorrer defeitos adquiridos ou congênitos na molécula do fibrinogênio. Os defeitos hereditários podem ser caracterizados por uma ausência de fibrinogênio plasmático (afibrinogenemia) ou por um defeito funcional da molécula (disfibrinogenemia). Os pacientes portadores de afibrinogenemia geralmente são diagnosticados ao nascer, quando podem apresentar hemorragia significativa. Os pacientes com disfibrinogenemia podem apresentar um quadro clínico bastante heterogêneo: aproximadamente a metade dos pacientes é assintomática; um quarto apresentará quadro hemorrágico; e os demais estarão associados com fenômenos trombóticos.

A afibrinogenemia hereditária é transmitida por um gene autossômico recessivo, com uma prevalência estimada em 1:1.000.000. A prevalência de hemofilia A (1:10.000) é muito maior que a afibrinogenemia. O diagnóstico da afibrinogenemia é feito com a ausência de formação de coágulo e, consequentemente, com os tempos incoaguláveis quando se faz o TP, o PTTA e o tempo de trombina (TT). O tempo de sangramento (TS) também está prolongado pela ausência de fibrinogênio nos grânulos α das plaquetas. A dosagem do fibrinogênio confirma o diagnóstico.

Na disfibrinogenemia ocorre um prolongamento nos tempos de coagulação do TP, PTTA e do TT. Na disfibrinogenemia associada com trombose pode ocorrer um encurtamento no TT. Em todos esses casos, a quantidade de fibrinogênio será normal.

FATOR II – PROTROMBINA

A protrombina é um fator de coagulação dependente da vitamina K para a sua síntese hepática. Após sua ativação pela protrombinase (fator Xa, fator Va, cálcio e fosfolipídio plaquetário), resulta a formação de trombina. A protrombina tem um peso molecular de 72 daltons e sua meia-vida é de 60 a 70 horas.

A prevalência aproximada de deficiência genética da protrombina é de1:1.000.000 a 1:2.000.000.

A suspeita diagnóstica surge quando encontramos um tempo de protrombina (TP) e um tempo de tromboplastina parcial ativada (PTTA) alterados. O diagnóstico específico requer a dosagem da protrombina.

Uma mutação na molécula da protrombina, caracterizada pela substituição da guanina pela adenina na posição 20.210 do gene da protrombina determina um risco maior de trombose.

FATOR III – FATOR TECIDUAL

O fator tecidual, com peso molecular de 45 Daltons, é um cofator associado às células que ativa o fator VII em fator VIIa e é considerado o gatilho fisiológico do sistema de coagulação na hemostasia normal e provavelmente em doenças trombóticas. O fator tecidual está presente nas células epiteliais, nos fibroblastos da adventícia dos vasos sanguíneos, astrocitos do cérebro e está exposto na injúria vascular.

Nenhum caso de deficiência de fator tecidual sugerindo que essa deficiência seja letal foi descrito até hoje.

FATOR V

O fator V ativado é um cofator que faz parte do complexo protrombinase, juntamente com o fator Xa e o fosfolipídio plaquetário. É fabricado no fígado, tem peso molecular de 300 daltons e uma meia vida de 12 a 24 horas.

A deficiência hereditária do fator V é transmitida por um gene autossômico recessivo, é rara e está associada com uma tendência hemorrágica que varia de leve a grave. Sua prevalência é cerca de 1:1.000.000.

A associação da deficiência do fator V com a deficiência do fator VIII, embora rara, é a interação mais frequente entre os fatores da coagulação.

A deficiência do fator V pode produzir um tempo de sangramento muito prolongado, provavelmente pela falta de fator V nas plaquetas. Está provado que 20% do fator V circulante está presente nos grânulos α das plaquetas.

A suspeita da deficiência de fator V ocorre quando encontramos um TP e um PTTA prolongados. O diagnóstico definitivo é feito com a dosagem específica do fator V.

O defeito genético mais conhecido do fator V é uma mutação que determina um ganho da função, como o que ocorre no fator V de Leiden, uma troca da arginina pela glutamina no códon 506. Essa mutação não cursa com hemorragia, mas ao contrário, os pacientes têm uma tendência à trombose.

FATOR VII

O fator VII é uma glicoproteína de peso molecular de 50.000 daltons, sintetizada pelo fígado, vitamina K dependente e que apresenta uma meia-vida mais curta entre os fatores de coagulação (4 a 6 horas). O fator VII é convertido para fator VIIa por uma pequena proteólise. Esta proteína, entretanto, tem discreta atividade fisiológica até combinar-se com o fator tecidual. O complexo formado pelo fator VIIa e fator tecidual converte o fator X para Xa na presença de fosfolipídio e do cálcio. O fator VIIa também converte o fator IX a fator IXa na presença do fator tecidual e do cálcio. Enquanto essas duas formas de ativação são mais importantes sob condições fisiológicas, estudos recentes efetuados *in vitro* têm demonstrado que o fator Xa é gerado quase exclusivamente pelo complexo fator VIIa-fator tecidual durante a fase inicial de ativação do mecanismo da coagulação.

A conversão do fator VII em fator VIIa ocorre na presença da trombina, fator IXa, fator Xa e do fator XIIa. Há evidências, também, de que o fator VIIa pode ser gerado por um mecanismo autocatalítico, e este mecanismo tem um importante papel na iniciação do mecanismo extrínseco da coagulação.

A deficiência hereditária do fator VII é transmitida por um gene autossômico recessivo, e o quadro hemorrágico pode ser leve, moderado ou grave. Mais de 100 mutações da molécula do fator VII já foram descritas. As manifestações hemorrágicas variam, mas, em pacientes com deficiência grave do fator VII, o quadro clínico é parecido com o da hemofilia. Interessante é que alguns pacientes com deficiência significativa do fator VII não apresentam sintomas hemorrágicos, podendo inclusive ser submetidos a cirurgias de grande porte sem hemorragia. A explicação para este fenômeno não está esclarecida.

Classicamente, suspeita-se da deficiência do fator VII quando o TP está prolongado e o PTTA normal. O diagnóstico definitivo é através da dosagem do fator VII

FATOR VIII

O fator VIII é uma glicoproteína de peso molecular de 300.000 daltons, com meia vida de 8–16 horas e que participa no meio do mecanismo intrínseco da coagulação. Ele é aparentemente sintetizado pelas células de Kupfer, no fígado, e secretado no plasma, onde ele circula, em parte, como um complexo com o fator de Von Willebrand (FVW).

O fator VIII funciona como um cofator na coagulação sanguínea, na qual acelera a conversão do fator X em fator Xa, na presença de fator IXa, cálcio e fosfolipídio. O fator VIII sofre discreta proteólise pela trombina e por outras proteases antes de mostrar sua atividade de cofator.

A deficiência genética do fator VIII, transmitida através de um gene recessivo ligado ao sexo, provoca a doença chamada de hemofilia A e a deficiência do fator IX, hemofilia B. Ambas apresentam o mesmo quadro clínico. A deficiência grave do fator VIII ou IX provocam hemartroses e hematomas recorrentes.

O diagnóstico de hemofilia A deve ser suspeitado quando encontramos um PTTA prolongado e um tempo de protrombina (TP) normal. O diagnóstico específico requer a dosagem do fator VIII.

Uma das complicações provocadas pelo tratamento com concentrado de fator VIII é o desenvolvimento de inibidor contra o fator VIII, que ocorre numa frequência entre 10% e 30% dos pacientes sob tratamento.

FATOR IX

O fator IX apresenta um peso molecular de 57.000 daltons, meia-visa de 18 a 30 horas, é uma proteína produzida no fígado e dependente da vitamina K. O fator IX, assim como os fatores XII, XI e VIII, participa do mecanismo intrínseco da coagulação.

A deficiência genética do fator IX é transmitida por um gene recessivo ligado ao sexo e provoca a doença chamada de hemofilia B, clinicamente indistinguível da hemofilia A. A hemofilia B é, aproximadamente, seis vezes menos frequente que a hemofilia A.

O diagnóstico é suspeitado quando encontramos um PTTA prolongado e um TP normal. A dosagem do fator IX é definitiva para o diagnóstico.

A presença de inibidor contra o fator IX está presente em aproximadamente 3% dos pacientes hemofílicos B grave.

FATOR X

O fator X é uma glicoproteína produzida pelo fígado, dependente da vitamina K, com peso molecular de 58.800 daltons e uma meia vida de 30 a 45 horas.

Na cascata da coagulação, a conversão do fator X em fator Xa é catalisada pelo fator IXa e na presença do fator VIIIa, cálcio e fosfolipídio. O fator X também é ativado pelo complexo fator VIIa-fator tecidual do mecanismo extrínseco.

A deficiência do fator X também pode ser leve, moderada ou grave e é transmitida por um gene autossômico recessivo. Os pacientes com deficiência grave apresentam um quadro clínico semelhante ao da hemofilia.

Como o fator X participa do mecanismo comum da coagulação, sua deficiência provoca um prolongamento no TP e no PTTA. O diagnóstico é confirmado com a dosagem do fator X.

FATOR XI

O fator XI é uma glicoproteína com peso molecular de 143.000 daltons, meia vida de 48 a 70 horas, que participa do mecanismo intrínseco da coagulação. Ele é sintetizado no fígado e secretado dentro do plasma como um zimogênio, que circula como um complexo com o cininogênio de alto peso molecular (CAPM).

A conversão do fator XI para fator XIa pela trombina ocorre na presença de materiais com carga negativa, tais como: sulfato de dextran, sulfatide e heparina. O fator XI também pode ser ativado pelo fator XIIa na presença do cininogênio de alto peso molecular e de superfícies carregadas negativamente.

A deficiência do fator XI é uma doença autossômica recessiva rara e pode provocar uma tendência a uma discreta hemorragia. Geralmente, a hemorragia ocorre após trauma ou pequenas cirurgias. A deficiência de fator XI é muito frequente nos Judeus Asquenazes.

O paciente com deficiência do fator XI vai apresentar um PTTA prolongado e um TP normal. O diagnóstico é feito pela dosagem do fator XI.

FATOR XII

O fator XII ou fator Hageman foi descoberto por Ratnoff e Colopy em 1955, através de estudos de coagulação feitos em um paciente chamado John Hageman. Esse paciente não apresentava tendência à hemorragia, embora apresentasse uma alteração da coagulação significativa *in vitro*. O fator XII tem um peso molecular de 90.000 daltons e uma meia vida de 40 a 70 horas.

A deficiência dos fatores XII, precalicreína (PK) e do cininogênio de alto peso molecular – os chamados fatores de contato – causa um significativo aumento no PTTA e um PT normal e ausência de história hemorrágica, mesmo em pacientes submetidos à cirurgia. Esses defeitos são transmitidos por um gene autossômico recessivo.

FATOR XIII

O fator XIII (fator estabilizador da fibrina) tem um peso molecular de 320.000 daltons e uma meia vida de 200–240 horas. Na presença da fibrina instável, a trombina converte o fator XIII em fator XIIIa. Como a trombina e a fibrina são geradas no estágio final do processo de coagulação, o fator XIIIa é um dos últimos eventos na cascata da coagulação. A deficiência de fator XIII pode provocar tendência à hemorragia persistente, demora na cicatrização e aborto espontâneo recorrente.

A deficiência genética do fator XIII é causada por um defeito na transglutaminase plasmática, que é necessária para a ligação covalente das cadeias α e γ da fibrina para formar a fibrina irreversível. Embora possa se formar na ausência do fator XIII, este coágulo é muito frágil e facilmente lisado pelo sistema fibrinolítico. O coágulo formado sem o fator XIII não forma uma rede de fibrina para uma boa cicatrização.

O fator XIII é sintetizado pelo fígado e a sua deficiência genética é transmitida por um gene autossômico recessivo. Manifestações hemorrágicas são geralmente graves e a hemorragia pode ocorrer em qualquer tecido.

As provas globais da coagulação (PTTA e TP) são normais, porque a fibrina instável é formada e suficiente para ser visualizada ou interromper o sistema de detecção de qualquer aparelho automatizado. O diagnóstico pode ser feito por meio de um teste qualitativo baseado na capacidade que tem uma solução de ureia 5 M dissolver o coágulo. Entretanto, esse teste é pouco sensível e testes que apresentam boa sensibilidade apresentam, ainda, um custo muito elevado.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Chung DW, Xu W, Davie EW. The Bloog Coagulation Factors and Inhibitors: Their Primary Structire, Complementary DNAs, Genes, and Expression. In: Marder VJ, Aird WC, Bennett JS, et al. Hemostasis and Thrombosis. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p.110-45.
2. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Molecular Biology and Biochesmistry of the Coagulation Factors and Pathways of Hemostasis. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, et al. Williams Hematology. New York: McGraw-Hill, 2010. p.1815-43.
3. Rezende SL. Fisiologia da Coagulação, Fibrinólise e Controle da Coagulação. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Tratado de Hematologia. São Paulo: Atheneu, 2013. p.577-90.

55

capítulo

Fernando Pretti

Abordagem do Paciente com Síndrome Hemorrágica

INTRODUÇÃO

A avaliação de um indivíduo com possível distúrbio hemorrágico sistêmico deve focar em uma das três possibilidades clínicas: 1) Indivíduos com uma história atual ou passada de hemorragia; 2) Indivíduos que apresentaram, de uma forma incidental, anormalidades nos testes de triagem da hemostasia; e, finalmente 3) Indivíduos sem história prévia de coagulopatias que fizeram testes para avaliação da hemostasia antes de um pré-operatório.

Na avaliação de indivíduos com uma história positiva de sangramento, a primeira questão deve ser dirigida para saber se o distúrbio hemostático é provocado por uma alteração sistêmica ou se é consequência de defeito anatômico ou mecânico de algum vaso sanguíneo. Este último problema é mais encontrado em pessoas com sangramento excessivo e inexplicável após um procedimento cirúrgico. Em muitos casos, uma história cuidadosa e o exame físico fornecerão informações diagnósticas. Em geral, indivíduos que sangram em múltiplos locais e em várias ocasiões são mais propensos a apresentarem defeitos sistêmicos da hemostasia, enquanto aqueles cujo sangramento está restrito ao local do trauma provavelmente têm uma causa anatômica para a hemorragia. Entretanto, essa generalização algumas vezes não se confirma. Por exemplo, pacientes com *teleangiectasia hemorrágica hereditária* podem apresentar, durante a vida, sangramentos recorrentes dos tratos respiratório e digestivo que poderiam dar uma forte sugestão de uma diátese hemorrágica sistêmica, a menos que um exame físico cuidadoso seja efetuado. Inversamente, um sangramento isolado, no local da cirurgia, pode ser a primeira manifestação de um defeito leve da hemostasia, não detectado antes da cirurgia, mesmo tendo sido feito os exames de triagem no pré-operatório.

Na abordagem dos pacientes que apresentam uma alteração nos testes de coagulação feitos de rotina, é importante interrogar se as alterações são clinicamente relevantes. Mais uma vez, uma história cuidadosa frequentemente dará a resposta. Por exemplo, pacientes com *deficiência congênita de fator XII, precalicreína e cininogênio de alto peso molecular* têm um extraordinário aumento no *tempo de tromboplastina parcial ativada* (PTTA), frequentemente mais prolongado do que em muitos pacientes hemofílicos, e, no entanto não apresentam sangramento. Pacientes com *anticoagulante lúpico* também apresentam prolongamento do PTTA sem tendência a sangramento. Pelo contrário, esses pacientes com defeito da coagulação na fase de contato e os que apresentam o anticoagulante lúpico sofrem o risco de trombose.

Esses exemplos ilustram a importância crítica de se considerar a *história*, o *exame físico* e os *testes laboratoriais* como uma faceta complementar da abordagem clínica do paciente com suspeita de uma coagulopatia sistêmica.

Embora seja do nosso conhecimento que a ativação das plaquetas e a ativação da coagulação não são processos independentes e que uma interação complexa e recíproca ocorre entre esses dois sistemas, é clinicamente conveniente separar os dois processos em *hemostasia primária* e *hemostasia secundária*. Na discussão da abordagem clínica dos pacientes com suspeita de coagulopatia sistêmica, chamaremos de hemostasia primária aquela relacionada com a *interação vaso-plaqueta* e de hemostasia secundária aquela relacionada com a *cascata da coagulação* culminando com a formação de fibrina.

HISTÓRIA E EXAME FÍSICO

Quando há a suspeita de uma coagulopatia em um indivíduo, vários aspectos da história podem fornecer pistas importantes para se estabelecer as possíveis causas. Muitas informações podem ser obtidas através de eventos traumáticos, tais como circuncisão, tonsilectomia, menstruação, parto, exodontias. A extração dentária é uma excelente avaliação da hemostasia, já que é um local da cavidade oral que apresenta uma alta concentração de atividade fibrinolítica. Indivíduos que apresentam uma anormalidade discreta da hemostasia podem sangrar excessivamente após exodontia, mas podem não apresentar hemorragia após cirurgias, até maiores, em outros sítios. Em outros casos, os pacientes podem fornecer

informações adicionais após serem submetidos a cirurgias ou traumas maiores. A história de uma hemostasia normal após tais eventos é tão importante como uma história positiva de hemorragia. *A informação de que uma pessoa foi submetida a uma cirurgia recentemente sem apresentar complicações hemorrágicas é o melhor teste para a avaliação da hemostasia, melhor do que qualquer prova laboratorial*.

Uma criteriosa história do uso de drogas e a coexistência de uma doença sistêmica deve ser obtida. O uso de *aspirina* e uma variedade de drogas anti-inflamatórias não esteroides, bem como uma infinidade de medicamentos, não informado pelo paciente pode causar disfunção plaquetária. Por essa razão, recomenda-se a suspensão da aspirina dez dias antes de uma cirurgia para evitar o risco de sangramento, principalmente em cirurgias neurológica e oftalmológica. Outras drogas, incluindo certos antibióticos, podem também causar alterações na função plaquetária, bem como trombocitopenia. Defeitos hemostáticos podem ser causados por algumas *doenças sistêmicas subjacentes*. Por exemplo, *insuficiência renal* está caracteristicamente associada com diminuição da função plaquetária. As *hepatopatias* podem estar associadas com trombocitopenia, deficiências de fatores da coagulação, coagulação intravascular disseminada (CID) e disfibrinogenemia. O *lúpus eritematoso sistêmico* e as *doenças linfoproliferativas* podem estar associados com trombocitopenia e anticoagulantes circulantes. As alterações da função plaquetária podem ocorrer nas *doenças mieloproliferativas*, enquanto a CID e a trombocitopenia podem ocorrer no curso de uma *septicemia* ou *câncer*. Em muitos desses casos, a doença de base é evidente e domina o quadro clínico. Também os *vírus da hepatite C, hepatite B* e o *HIV* podem ser causa de uma trombocitopenia.

É importante salientar que, enquanto uma história familiar positiva de sangramento ajuda a elucidar a natureza de uma suposta coagulopatia, uma história familiar negativa não exclui a possibilidade de uma doença hemorrágica hereditária. Por exemplo, sabemos que mais ou menos 30% das hemofilias surgem de uma mutação espontânea, faltando, portanto, qualquer história familiar positiva de sangramento. Mesmo na ausência de uma história familiar positiva, um indivíduo que apresenta, ao longo da vida, complicações hemorrágicas recorrentes deve ser investigado pensando-se numa coagulopatia genética. As características clínicas do sangramento geralmente revelam qual é o tipo de defeito da hemostasia envolvido. Em geral, pessoas com defeito da hemostasia primária (p. ex.: trombocitopenia, disfunção plaquetária e defeitos vasculares) tendem a apresentar hemorragia superficial na pele ou mucosas que ocorre de uma forma espontânea ou após trauma. As *petéquias* (caracteristicamente observadas nas pessoas com trombocitopenia severa), as *equimoses*, a *hemorragia digestiva*, a *hemorragia do trato gênito-urinário*, a *hemoptise* ou a *epistaxe* são manifestações clínicas típicas de defeito da hemostasia primária. A presença de equimoses espontâneas pelo corpo, sem estar associada com qualquer alteração nas provas da hemostasia, é um achado clínico frequente, principalmente nas mulheres – é a chamada *púrpura simples* –, muito relacionada com problemas emocionais. Em contraste, indivíduos com alteração da fase secundária da hemostasia (p. ex.: hemofilia) apresentam, caracteristicamente, hemorragia profunda nos tecidos, tais como, *hemartroses*, *hematomas* ou *sangramento retroperitoneal*. Outra característica clínica dos defeitos da hemostasia secundária é a tendência ao sangramento tardio, após uma cirurgia ou trauma, ao contrário do que acontece nos defeitos da hemostasia primária, na qual a tendência é ocorrer um sangramento logo após o procedimento cirúrgico ou trauma. Uma história de *dificuldade na cicatrização* pode sugerir uma deficiência do fator XIII. Indivíduos com distúrbios hemostáticos mais complexos (p. ex.: CID, hepatopatias) podem apresentar um quadro clínico misto de sangramento, associado com defeitos tanto da hemostasia primária como secundária.

TESTES LABORATORIAIS

Duas categorias gerais de testes laboratoriais da hemostasia são recomendadas para sabermos se um paciente tem um defeito hemorrágico sistêmico: 1) Testes de triagem e os 2) Testes especializados.

Os testes de triagem são simples e rapidamente realizáveis em laboratórios gerais, embora possam apresentar resultados falsos e provocar interpretações errôneas que podem resultar na solicitação de um parecer do hematologista, com relativa frequência. Convencionou-se chamar de "coagulograma" um conjunto de sete provas da hemostasia, sobre as quais faremos um comentário crítico de suas indicações e interpretações. Essas provas são: 1) Tempo de sangramento; 2) Prova do laço; 3) Retração do coágulo; 4) Contagem de plaquetas; 5) Tempo de coagulação; 6) Tempo de protrombina (TAP ou TP); e 7) Tempo de tromboplastina parcial ativada (PTTA ou APTT ou PTTK). As quatro primeiras provas avaliam somente a primeira fase da hemostasia, e a três últimas, a segunda fase.

Os testes especializados da hemostasia geralmente são indicados após a realização dos testes de triagem, por duas razões: 1) Os testes especializados foram necessários porque um ou mais testes de triagem foram anormais; e 2) Os testes de triagem foram normais, mas a história e/ou o exame físico indicam que a chance de um distúrbio da hemostasia existe.

TESTES DE TRIAGEM

Tempo de sangramento

O tempo de sangramento é uma prova feita *in vivo*, que pode apresentar alteração nos defeitos quantitativos das plaquetas (trombocitopenias), nos defeitos qualitativos plaquetários (trombocitopatias), nos defeitos de interação vaso-plaqueta (doença de von Willebrand) e nas alterações vasculares. O método mais utilizado nos laboratórios gerais é o de Duke, o qual consiste numa injúria vascular provocada por uma lanceta padronizada no lobo da orelha. O tempo de sangramento normal varia de 1 a 3 minutos. Esse método é prático, mas tem pouca sensibilidade e especificidade. O outro método é o de Ivy, mais sensível, mas pouco realizado na rotina dos laboratórios gerais por se tratar de um exame

que depende de um corte, na face anterior do antebraço, de 10 mm de extensão por 1 mm de profundidade. O valor normal varia de 3 a 8 minutos.

O tempo de sangramento pode variar consideravelmente nos pacientes com doença de von Willebrand e nos pacientes trombocitopênicos. Em razão disso, não vemos a necessidade de executar este exame já que a própria contagem de plaquetas define o problema. Embora alguns autores recomendem a inclusão do tempo de sangramento como um exame de triagem na avaliação da hemostasia primária, nós somos da opinião de que essa prova é desnecessária, considerando sua pouca sensibilidade e a necessidade de efetuarmos testes especiais quando o resultado desse exame apresenta alteração. Nos pacientes que apresentam uma história positiva de sangramento com um teste de triagem normal, ou seja, um coagulograma sem alterações, sugerimos a avaliação de provas especiais por um especialista.

Prova do laço

Da mesma forma que o tempo de sangramento, a prova do laço é efetuada *in vivo* e avalia a quantidade de plaquetas, a função plaquetária e distúrbios vasculares. Consiste em garrotear o braço para dificultar o retorno venoso e, com isso, facilitar a passagem do sangue do vaso para a pele de modo a apresentar determinada quantidade de petéquias na face anterior do antebraço. O teste é dito positivo ou negativo conforme a presença ou ausência de petéquias na face anterior do antebraço. Mais ainda que o tempo de sangramento, a prova do laço tem pouca sensibilidade, e consideramos que este também é um exame desnecessário.

Retração do coágulo

A retração do coágulo é um exame efetuado *in vitro* e pode alterar-se somente nos defeitos quantitativos e qualitativos das plaquetas. Não tem capacidade, portanto, de alterar-se nos defeitos vasculares. A retração depende basicamente de um bom número de plaquetas, bem como de uma contração normal plaquetária, mediada pela actina-miosina. As hemácias se opõem à retração das plaquetas, tanto é que, nos pacientes policitêmicos, encontramos uma retração do coágulo diminuída *in vitro* (sem repercussão clínica) e uma retração aumentada no paciente anêmico (também sem repercussão clínica). O resultado é expresso da seguinte forma: retração completa, retração parcial e coágulo irretrátil. A causa mais frequente de alteração da retração do coágulo é a trombocitopenia, cuja contagem das plaquetas já define o problema. A única alteração funcional das plaquetas que altera a retração do coágulo é a *trombastenia de Glanzmann*, uma doença hemorrágica grave, genética e pouco frequente. Também achamos desnecessária a inclusão da retração do coágulo no grupo de exames obrigatórios, considerando que a trombastenia de Glanzmann é muito rara e apresenta um quadro clínico de hemorragia tão exuberante que ninguém deixaria de fazer o diagnóstico dessa patologia, uma vez que a abordagem clínica já mostraria a gravidade da doença.

Contagem de plaquetas

Embora não tenha uma relação absoluta entre o número de plaquetas e a gravidade da hemorragia, o sangramento espontâneo sem trauma não ocorre com frequência, a menos que a contagem de plaquetas seja menor que 10.000/mm^3, e a hemorragia importante após trauma ou lesão local é pouco frequente com contagem acima de 50.000/mm^3. Uma contagem diminuída de plaquetas deve sempre ser seguida do exame do esfregaço sanguíneo. Esse cuidado pode revelar o diagnóstico de anormalidades em outras células (p. ex.: hemácias fragmentadas na púrpura trombocitopênica trombótica, blastos na leucemia aguda) ou a presença de grumos plaquetários, que são característicos de certas formas de pseudotrombocitopenia. A pseudotrombocitopenia é um fenômeno de falsa contagem baixa de plaquetas que pode ser devida a uma variedade de artefatos laboratoriais. O fenômeno deve ser suspeitado quando uma contagem baixa de plaquetas é encontrada em uma pessoa que não apresenta nenhum quadro clínico de sangramento. Isso está, às vezes, associado com *pseudoleucocitose*, quando grumos plaquetários formados *ex vivo* são grandes o suficiente para imitar os leucócitos no contador eletrônico de células, ou *pseudoleucopenia*, quando as plaquetas aderem aos leucócitos (satelitismo), provocando uma falsa contagem, para baixo, das plaquetas.

Uma contagem falsa de plaquetas também pode ser causada pela coleta imprópria do sangue, quando uma coagulação discreta do sangue ocorre sem que o analista perceba. Em certas ocasiões, as plaquetas gigantes (macroplaquetas) são excluídas do contador automático e, portanto, uma *trombocitopenia artefatual* pode ocorrer. As plaquetas gigantes podem ocorrer em várias doenças hematológicas, doenças mieloproliferativas e a púrpura trombocitopênica imunológica (PTI). Além dessas patologias, existe um grupo de doenças hereditárias raras, caracterizadas pela presença de plaquetas gigantes no sangue periférico, contagem diminuída das plaquetas e variável grau de sangramento; essas patologias incluem a *síndrome de Bernard-Soulier*, *anomalia de May-Hegglin*, *síndrome da plaqueta cinza* (gray platelet syndrome) e *síndrome da plaqueta de Montreal*.

A agregação plaquetária induzida pelo EDTA é a causa mais comum de pseudotrombocitopenia, com trabalhos mostrando uma incidência que varia de um caso para 50 indivíduos hospitalizados até 1 para 1.000 pessoas. Tem sido descrito que esse fenômeno é a segunda causa mais frequente de trombocitopenia isolada, relacionada com a prática hematológica. Isso é devido à presença de aglutinação das plaquetas por anticorpos que reagem com as plaquetas na presença do EDTA, usado como anticoagulante de rotina nos tubos de coleta para contagens de glóbulos. Mais recentemente, trabalhos têm mostrado que esse fenômeno ocorre virtualmente com qualquer tipo de anticoagulante, embora seja mais pronunciado com o EDTA. Essa falsa trombocitopenia tem sido chamada de *pseudotrombocitopenia induzida pelo EDTA*. Os componentes da membrana plaquetária expostos ao EDTA *ex vivo* podem sofrer alterações, expondo neoantígenos aos quais

anticorpos aglutinantes se ligam. Em muitos casos esses anticorpos estão direcionados contra os receptores da membrana plaquetária, as glicoproteínas IIb ou ao complexo IIb-IIIa. Esse fenômeno de indução da trombocitopenia pelo EDTA ocorre mais frequentemente em pacientes hospitalizados, com doença grave, embora não seja pouco frequente também em pessoas saudáveis e desprovido de significado patológico. A pseudotrombocitopenia tem sido encontrada frequentemente associada com a síndrome antifosfolipídio. Esse quadro de pseudotrombocitopenia induzida pelo EDTA é diagnosticado da seguinte maneira: 1) uma contagem eletrônica de plaquetas diminuída; 2) a presença de grumos plaquetários no esfregaço sanguíneo efetuado de sangue colhido com EDTA; e 3) uma contagem de plaquetas com sangue colhido num tubo de plástico de polipropileno, sem anticoagulante, passando o material imediatamente no contador eletrônico. Algumas aglutininas plaquetárias reagem bem em temperaturas abaixo de 37 °C (aglutininas a frio) e, portanto, causam pseudotrombocitopenia por formação de grumos em amostras de sangue mantidas em temperatura mais fria por algum tempo. Quando esse fenômeno é suspeitado, recomenda-se efetuar a contagem de plaquetas à temperatura ambiente e outra contagem logo após incubação em banho-maria a 37 °C.

Tempo de coagulação

O tempo de coagulação (TC) avalia os mecanismos intrínseco e comum da coagulação. O método é o de Lee-White e seu valor de referência varia de 5 a 10 minutos. O TC é um teste de pouca sensibilidade e pode dar um resultado de tempo na faixa da normalidade mesmo que o paciente seja hemofílico. Esse é um teste que deve ser abolido, já que pode oferecer uma falsa segurança, principalmente para o cirurgião, quando o seu valor estiver na faixa de normalidade. O teste que substitui o TC é o tempo de tromboplastina parcial ativada (PTTA), o qual apresenta muito mais sensibilidade.

PTTA

O tempo de tromboplastina parcial ativada é um excelente teste para detectar defeitos do mecanismo intrínseco da coagulação. Ele avalia tanto o mecanismo intrínseco como o mecanismo comum. O PTTA estuda os mesmos fatores que o tempo de coagulação, só que de uma maneira mais sensível e reprodutível e, geralmente, encontra-se alterado quando os níveis de fatores estão abaixo de 30%. O PTTA encontra-se prolongado nas deficiências do *cininogênio de alto peso molecular*, *pré-calicreína*, *fatores XII*, *XI*, *IX*, *VIII*, *X*, *V*, *II (protrombina)*, *I (fibrinogênio)* e pelos *inibidores da coagulação*, tais como *anticoagulante lúpico*, *heparina*, e pelos *produtos de degradação da fibrina (PDF)*. O PTTA só não avalia o *fator VII*, pertencente ao mecanismo extrínseco da coagulação, e o *fator XIII* do mecanismo comum da coagulação. Os anticoagulantes orais também podem alterar o PTTA, já que, dos fatores dependentes da vitamina K, somente o fator VII não participa do mecanismo estudado pelo PTTA. No entanto, para o controle de anticoagulação, quando se usa os cumarínicos, o tempo de protrombina (TP) é mais adequado e padronizado como teste de coagulação para avaliar a eficácia dos anticoagulantes orais. O contrário ocorre quando o anticoagulante usado é a heparina. Nesse caso o exame indicado é o PTTA, muito mais sensível do que o TP.

O resultado pode ser expresso em tempo, relação paciente/controle ou um valor de referência citado pelo laboratório. É conveniente e recomendado que cada laboratório estabeleça seus valores de referência, levando-se em conta os critérios pré-analíticos, reagentes utilizados, equipamentos e até o profissional que executará os exames. Resultados falsos-positivos (tempos prolongados) podem ocorrer quando a amostra é retirada de um cateter contaminado com heparina ou o paciente apresenta uma policitemia (aumenta a relação do anticoagulante/plasma). Resultado com tempo encurtado pode ser fisiológico ou pode representar, segundo alguns pesquisadores, um risco trombótico aumentado. O PTTA é o teste de escolha para monitorizar o paciente que está usando a heparina não fracionada como terapia anticoagulante.

Um procedimento simples e que pode fornecer muita informação diante de um PTTA alterado é fazer uma prova de mistura do plasma do paciente com um plasma normal. Quando há correção do tempo após a mistura, sugere a deficiência de fator de coagulação (p. ex.: hemofilia) e, quando não há a correção, é provável que se trate da presença de um inibidor (p. ex.: heparina ou anticoagulante lúpico).

Um PTTA prolongado, sem que o clínico tenha uma explicação para tal, deve ser esclarecido pelo especialista.

Tempo de Protrombina (TP)

O TP ou TAP avalia os mecanismos extrínseco e comum da coagulação. Nesse teste, a tromboplastina tecidual (fator III), uma lipoproteína extraída do cérebro de coelho, é adicionada ao plasma e o tempo de coagulação é medido após a adição do cálcio. O tempo de protrombina é geralmente de 10 a 14 segundos, bem menor que os usuais 25 a 40 segundos do PTTA. Esse tempo de coagulação mais rápido é o resultado da formação de um complexo da tromboplastina tecidual com o fator VII, determinando uma ativação direta do fator X, fazendo uma derivação da ativação mais lenta que ocorre através do mecanismo intrínseco. O TP pode prolongar-se nas deficiências dos fatores VII, X, V, II e fibrinogênio e também na presença de inibidores, como a heparina não fracionada (em dose alta) ou, mais raramente, inibidores do fator V. O anticoagulante lúpico, por ser considerado um inibidor fraco da coagulação, não costuma alterar o TP. As tromboplastinas de hoje, usadas como reagente do TP, não têm sofrido tanta interferência da heparina, o que facilita o estudo dos pacientes que estão usando anticoagulante oral e heparina concomitante. Um TP prolongado com um PTTA normal sugere a deficiência do fator VII. Uma deficiência isolada de fator VII ocorre na deficiência congênita do fator VII, no início do uso de uma terapia com anticoagulante oral e numa deficiência, também inicial, de vitamina K e numa hepatopa-

tia discreta. Em contrapartida, um paciente que apresenta um PTTA prolongado com um TP normal sugere um defeito no mecanismo intrínseco da coagulação (p. ex.: deficiência de fator VIII ou IX e mais raramente os demais).

Uma deficiência grave de vitamina K, uma hepatopatia (p. ex.: cirrose) ou níveis terapêuticos de cumarínicos resultam num TP e PTTA prolongados, como resultado do decréscimo dos fatores II, VII, IX e X (dependentes da vitamina K). Embora o PTTA possa se alterar com a administração do anticoagulante oral (cumarínicos), o TP é o exame de escolha para monitorizar a anticoagulação, porque é mais sensível e é padronizado internacionalmente. O resultado do TP é expresso em tempo, atividade, relação paciente controle e INR. O INR (relação normatizada internacional) foi introduzido com o objetivo de uniformizar os resultados discrepantes dos pacientes em uso de cumarínicos, quando baseados na atividade. Isso ocorria em decorrência das diferentes sensibilidades das tromboplastinas comerciais, usadas como reagente. Após uma comparação com uma tromboplastina de referência, calcula-se o seu índice de sensibilidade internacional (ISI) e os reagentes são lançados no mercado com ISI específico para cada fabricante e cada lote do produto. Entretanto, nada disso é útil se cada laboratório não tiver o cuidado de padronizar os seus valores de referência nas suas condições de trabalho. O INR deve ser utilizado como forma de interpretação do resultado apenas para os pacientes anticoagulados com cumarínicos. Para avaliação da função hepática e como prova de coagulação num pré-operatório os resultados devem ser expressos e interpretados como tempo e atividade e relação paciente/controle. O TP normal varia de 70% a 100% de atividade ou uma relação paciente/controle até 1,2. Uma atividade acima de 100% não tem significado clínico.

ROTINA NO PRÉ-OPERATÓRIO

A avaliação pré-operatória de uma cirurgia geral eletiva tradicionalmente inclui um painel dos exames de hemostasia que foram discutidos acima. Entretanto, muitos cirurgiões sugerem que tal rotina, em todos os casos pré-operatórios, é contraproducente e desnecessária, podendo em muitos casos atrasar a data da cirurgia. Fatores que contribuem para continuar praticando essa rotina laboratorial incluem o medo da responsabilidade pelo erro médico e a relutância dos médicos em abandonar uma conduta estabelecida na comunidade médica. Estudos recentes concordam que os testes de rotina para coagulopatias efetuados nos pacientes com história e exame físico negativos são desnecessários e não precisam ser feitos. O coagulograma está recomendado como teste pré-operatório nos pacientes com dificuldade de obtenção de informações clínicas, indivíduos com clínica sugestiva de tendência à hemorragia, incluindo aqueles com hepatopatia, síndrome disabsortiva ou malnutrição e indivíduos cuja coagulação é normal mas pode ser alterada pelo próprio tipo de cirurgia efetuada (p. ex.: prostatectomia, revascularização cardíaca, inserção de shunt peritôneo-venoso). A complicação hemorrágica no per e pós-operatório é uma justificativa defendida por muitos autores para a solicitação do coagulograma de rotina em todos os pacientes cirúrgicos. O paciente que apresenta hemorragia durante ou após a cirurgia, com um exame prévio normal, sugere que a complicação hemorrágica ocorreu em decorrência da manipulação cirúrgica e não por uma alteração prévia.

Rapaport, no entanto, sugere quatro razões para justificar os testes pré-operatórios de rotina em adição à história: 1) pode proteger o médico que falhou na obtenção da história; 2) alguns indivíduos negam informações na história; 3) um paciente com uma história negativa que nunca foi exposto a um trauma maior pode ter um defeito leve da hemostasia (p. ex.: deficiência de fator XI, trombocitopenia discreta a moderada) e apresentar sangramento após uma cirurgia planejada; e 4) um paciente que já tenha sido submetido a uma cirurgia anterior sem sangramento excessivo, mas que pode ter adquirido um distúrbio da hemostasia (p. ex.: trombocitopenia, hepatopatia).

Finalmente, num extremo, nenhuma prova de rotina seria sugerida no pré-operatório de um paciente com história negativa para sangramento. Noutro extremo, indivíduos com história de sangramento são muito suspeitos de serem portadores de uma importante alteração hemostática e devem ser submetidos a uma avaliação de rotina e, mesmo que os exames sejam normais, outros testes mais especializados, através de orientação do hematologista, deverão ser solicitados antes de qualquer procedimento cirúrgico. Indivíduos entre esses extremos, incluindo aqueles cuja história levanta a possibilidade de um defeito hemostático ou aqueles com história negativa, mas cujo procedimento ao qual serão submetidos poderá prejudicar a hemostasia ou, mesmo com mínimo sangramento pós-operatório, poderá ser fatal, devem fazer o coagulograma.

EXAMES DE TRIAGEM SUGERIDOS

- Contagem de Plaquetas
- Tempo de Protrombina – TP
- Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado – PTTA

Quando os exames de triagem forem normais, porém com persistência de história positiva de sangramento, tornam-se necessários outros exames mais complexos para uma boa avaliação da hemostasia. Esses exames deverão ser orientados por um hematologista, já que muitas vezes são provas trabalhosas e caras:

- Agregação plaquetária
- Dosagem do fator VIII
- Dosagem do fator IX
- Dosagem de outros fatores (p. ex.: XIII – XII – XI – X – VII – V – II e fibrinogênio)
- Anticoagulante lúpico
- Fator de von Willebrand
- Cofator da ristocetina
- Multímeros do Fator de von Willebrand
- Estudo da fibrinólise etc

AVALIAÇÃO DA HEMOSTASIA NO PRÉ-OPERATÓRIO

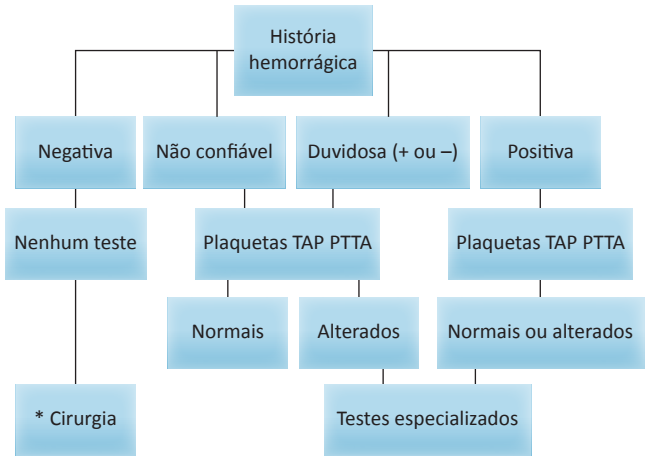


Figura 55.1 Hemostasia no pré-operatório.

* Considerar a necessidade do exame nas cirurgias de risco maior (p. ex.: neurocirurgia, cirurgia cardiovascular, cirurgia oftalmológica etc).

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Hayward CPM, Pai M, Liu CY, et al. Diagnostic utility of light transmission platelet aggregometry: results from a prospective study of individuals referred for bleeding disorders assessments. J Thromb Haemost. 2009;7(4):676-84.
2. Hemostasis and Thrombosis. 6.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p.645-58.
3. Johnsen JM, Konkle BA. Differencial Diagnosis of the Bleeding Patient. In: In Marder VJ, Aird WC, Bennett JS, Schulman S, White GC, II (eds).
4. Kitchen S, Makris M. Laboratory Tests of Hemostasis. In: O´ Shaughnessy D, Makris M, Lillicrap D. Australia:Victoria, 2005. p.8-17.
5. Lourenço DM. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Tratado de Hematologia. São Paulo: Atheneu, 2013. p.583-90.
6. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. J Thromb Haemost. 2010;8(9):2063-5.

56

capítulo

Fernando Pretti

Púrpuras Vasculares

INTRODUÇÃO

A púrpura resulta da incompetência das plaquetas e dos capilares da derme ou dos pequenos vasos sanguíneos em reter os eritrócitos dentro do espaço vascular. As púrpuras vasculares resultam de anormalidades da vasculatura e do envolvimento do vaso. Elas devem ser distinguidas das lesões causadas pelos defeitos quantitativos ou funcionais das plaquetas e defeitos do mecanismo de coagulação.

Quando as lesões estão presentes, o médico deve determinar se o sangue é intravascular ou extravascular. A compressão com o dedo ou a vitropressão diferencia a lesão decorrente do extravasamento de sangue do vaso para a derme (p. ex.: petéquia) da alteração vascular com sangue presente no interior do vaso (p. ex.: teleangiectasia). A primeira não desaparece com a compressão ou vitropressão, já a segunda empalidece após esse procedimento. Quando as lesões são menores que 3 mm recebem o nome de petéquias, e as lesões maiores, geralmente resultantes de rupturas de arteríolas, vênulas ou vasos mais calibrosos, são chamadas de equimoses.

A integridade da barreira vascular depende do número suficiente e função normal das plaquetas e da integridade das células endoteliais, do subendotélio e da matriz do tecido conjuntivo. Mediadores inflamatórios produzidos pelos leucócitos ou uma resposta imune humoral podem distender a barreira endotelial permitindo a passagem de líquido e proteína, causando edema local. Quando combinado com o extravasamento de eritrócitos, a púrpura da vasculite poderá ser palpável. O aumento da pressão transmural, que é observada em algumas regiões do corpo durante a manobra de Valsalva tosse ou grandes altitudes, podem exacerbar o extravasamento. Vasos sanguíneos dilatados podem aparecer como lesões vermelhas da pele e mucosas. Se a integridade vascular é mantida, essas lesões empalidecem com a pressão. Elas podem resultar de uma resposta fisiológica à inflamação, de malformações congênitas, de trauma ou consequente à doença sistêmica, como hepatopatia crônica.

HISTÓRIA DO PACIENTE

Para muitos pacientes com alteração da hemostasia e doença vascular, a anamnese é soberana. Quando as lesões começaram a surgir pode ajudar a distinguir uma causa congênita da adquirida. O tempo de evolução e a avaliação visual das lesões, assim como tamanho, cor, área afetada, episódios anteriores e suas relações com trauma, picada de insetos, ajudam na elucidação. Febre associada pode estar relacionada com infecção ou vasculite; outras manifestações hemorrágicas, tais como epistaxe, gengivorragia, hemorragia digestiva ou sangramento após cirurgia sugerem um distúrbio hemostático sistêmico. Uma transfusão sanguínea remota ou recente pode também ser relevante.

Uma história de doenças concomitantes, tais como uremia, infecção, endocrinopatia ou doença inflamatória, deve ser procurada, e toda medicação usada, especialmente corticosteroides, aspirina e anti-inflamatórios não esteroides, deve ser suspeitada. Corticosteroides tópicos podem causar alterações dermatológicas locais. Alguns produtos congêneres de ação prolongada, quando usados topicamente em grande quantidade, podem ser absorvidos e apresentar efeitos sistêmicos. Muitas formulações contêm aspirina, e as pessoas podem ignorar a sua presença. Qualquer história de alergia, especialmente a medicamentos, é essencial; e uma história familiar é importante para determinar se parentes são afetados. Uma história social, com especial atenção a produtos químicos ou trauma, o uso de álcool, drogas não medicamentosas e hábitos sexuais deve ser obtida com atenção. Viagens para grandes altitudes ou regiões onde certas doenças infecciosas são endêmicas podem ser relevantes, e uma história dietética e nutricional pode revelar deficiência de vitaminas. Finalmente, uma revisão clínica apurada pode revelar alguma doença subjacente, como lúpus eritematoso sistêmico, doença hepática ou mesmo uma neoplasia.

EXAME FÍSICO

Um exame físico completo deve ser efetuado para avaliar qualquer anormalidade coexistente. Através de um exame dermatológico deve ser examinado o couro cabeludo, mucosa oral, conjuntivas, leito ungueal, mucosa nasal e a pele de todo o corpo. A endoscopia digestiva alta, a retossigmoidoscopia e a colonoscopia são exames que podem complementar a investigação clínica.

AVALIAÇÃO LABORATORIAL

Nas doenças vasculares, as provas laboratoriais da hemostasia são quase sempre normais. Os exames laboratoriais são importantes no sentido de afastar outras causas de púrpura ou identificar outras falhas na hemostasia que poderiam agravar as alterações vasculares. Uma avaliação mínima deve incluir um hemograma, contagem de plaquetas, tempo de protrombina (TP) e um tempo de tromboplastina parcial ativada (PTTA).

Uma contagem de plaquetas discretamente diminuída em uma pessoa com púrpura palpável pode sugerir uma vasculite ou uma doença autoimune. Hemácias fragmentadas com trombocitopenia indica microangiopatia acompanhando a púrpura trombocitopênica trombótica, síndrome hemolítico-urêmica, coagulação intravascular disseminada ou hipertensão arterial maligna. Um TP ou PTTA prolongado pode sugerir um defeito primário da coagulação ou, quando acompanhado de trombocitopenia, podemos pensar numa hepatopatia crônica ou numa coagulopatia de consumo. Outros testes especializados também podem ser indicados. Uma disfunção plaquetária com número normal de plaquetas ou uma morfologia anormal pode ser avaliada através de um estudo de agregação plaquetária. Exemplos de doenças caracterizadas por um defeito na função plaquetária são: Síndrome de Bernard-Soulier; Trombastenia de Glanzmann e outras trombocitopatias.

Equimoses tardias do pós-operatório ou pós-traumática podem ser decorrentes de uma deficiência de fator XIII, o qual determina a formação de uma fibrina pobre e friável. Esta deficiência não é detectada pelos exames de triagem da coagulação e, para o diagnóstico, é necessária uma solicitação especial da dosagem do fator XIII. Outra causa rara de equimoses tardias é a deficiência ou defeito na molécula do fibrinogênio.

O Tempo de Sangramento merece uma atenção especial, porque sua utilidade é bastante limitada. Sua sensibilidade é muito pequena e frequentemente não adiciona qualquer informação útil em relação a outros testes mais específicos para avaliação da hemostasia. O uso desse teste justifica-se, portanto, em casos individuais e selecionados pelo hematologista.

PÚRPURA MECÂNICA

A púrpura mecânica é induzida por um trauma local e aparece como petéquias. Por definição é localizada na área diretamente envolvida com o trauma. Na rara síndrome da púrpura das grandes altitudes ela pode, no entanto, aparecer de uma forma generalizada. Antes de essa púrpura ser atribuída como estritamente de causa mecânica deve ser afastada a possibilidade de um defeito quantitativo ou qualitativo das plaquetas.

A púrpura mecânica resulta de uma ruptura da integridade vascular com subsequente passagem de hemácias para a derme. O trauma mecânico pode ser consequência de uma pressão hidrostática diferencial, tais como grandes altitudes, ressuscitação cardiopulmonar, sucção provocada por um beijo. A tosse em paroxismo pode provocar petéquias na face e no tronco. Petéquias podem aparecer, também, em torno de qualquer área que foi fisicamente ou quimicamente traumatizada, tais como exposição à luz do sol, escoriação provocada pelo mato ou um forte aperto de mão.

PÚRPURA SENIL

São equimoses que aparecem, com mais frequência, sobre as áreas expostas dos braços e pernas nas pessoas mais idosas. Essa púrpura senil é o resultado da falta de suporte aos capilares provocado por alteração no tecido conjuntivo. O colágeno mostra uma elastose e atrofia e os vasos apresentam uma estrutura normal. Algumas situações podem acentuar o aparecimento dessa púrpura, tais como a irradiação solar, o uso de corticosteroides e hipoproteinemia. Não há necessidade de nenhum tratamento específico.

PÚRPURA METABÓLICA

Como exemplos de púrpura metabólica, citamos a *deficiência de vitamina C* e o *excesso de corticosteroides*. A vitamina C é importante para a síntese do colágeno e sua deficiência compromete a estrutura do vaso sanguíneo e do tecido conjuntivo.

Os corticosteroides em excesso diminuem a síntese do colágeno e do tecido conjuntivo e a púrpura surge nos pacientes com hipersecreção da adrenal, na administração exógena de corticosteroide e na hipersecreção de ACTH pela hipófise (síndrome de Cushing).

PÚRPURA SECUNDÁRIA À INFECÇÃO

Muitas doenças infecciosas podem causar lesões purpúricas. São vários os prováveis mecanismos: invasão direta do microrganismo na parede do vaso, embolia séptica com inflamação e infarto local, vasculite por imunocomplexos e coagulação intravascular disseminada com trombocitopenia.

Virtualmente qualquer infecção pode causar púrpura, e vários agentes estão associados com as lesões vasculares (Tabela 56.1).

Tabela 56.1 Agentes infecciosos e púrpura.

Bactérias	Hemófilos – *Estreptococo* – *Neisseria* – *Bordetela* – *Rickettsia*
Vírus	Enterovírus – Sarampo – Rubéola – Vírus Sincicial Respiratório – ECHO Vírus – Vírus *Coxsackie* – Vírus da Hepatite A – Vírus da Hepatite B – Parvovírus B19 – Varicela
Vacinas	Sarampo – *Influenza* – Tétano – Difteria-coqueluche
Protozoários e larvas	Malária – *Strongyloides*
Fungos	Cândida – Tricosporo

PÚRPURA DAS DISPROTEINEMIAS

As disproteinemias podem causar púrpura, tais como *mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Wandenstrom, amiloidose, hipergamaglobulinemia policlonal benigna* e a *síndrome de proteínas insolúveis a frio.* O aumento da pressão hidráulica da manobra de Valsalva frequentemente causa o aparecimento de petéquias em volta da órbita ocular por ruptura dos pequenos vasos. A deposição de proteínas anômalas em torno dos capilares da derme provoca interrupção da integridade dos capilares.

Duas síndromes de proteínas insolúveis a frio podem provocar púrpura. A primeira, a *crioglobulinemia*, resulta da precipitação a frio de imunoglobulinas, frequentemente IgM. A segunda, a *criofibrinogenemia*, resulta da mistura de fibrinogênio insolúvel a frio, fibrina e produto de degradação da fibrina, fator de von Willebrand e fator XIII. Essa síndrome, tanto pode ocorrer secundariamente a processos inflamatórios, por neoplasias, especialmente do tecido linfoide, como de forma idiopática. A hepatite C pode ser uma causa secundária de crioglobulinemia. As lesões purpúricas são decorrentes da oclusão das pequenas arteríolas pelo crioprecipitado.

Essas síndromes podem ser confundidas com a doença da aglutinina a frio (crioaglutininemia), que, no entanto, é causada por anticorpo do tipo IgM com especificidade anti-Ii do grupo sanguíneo, o qual aglutina as hemácias. As crioaglutininas podem ser, também, idiopáticas ou secundárias a infecção com o *Mycoplasma pneumoniae*, Epstein-Barr ou doenças linfoproliferativas. As crioaglutininas não causam púrpuras, mas podem ocorrer associadas com crioglobulinas.

As crioglobulinas e o criofibrinogênio que causam essas alterações precipitam-se após incubação do plasma à temperatura de 4 °C por um período de 24 a 72 horas. A razão bioquímica para a precipitação anormal dessas proteínas é desconhecida.

Tipicamente, as lesões são purpúricas ou equimoses na região distal dos dedos, orelhas, extremidades inferiores e genitália, provavelmente por causa da baixa temperatura, que causa crioprecipitação nas regiões distais.

PÚRPURA *FULMINANS*

A púrpura fulminans manifesta-se com a presença maciça de equimoses, que podem ocorrer de uma forma aguda por uma deficiência de proteína C ou proteína S. Tal deficiência pode ocorrer durante uma coagulação intravascular disseminada (CID), no início do tratamento com varfarina ou no recém-nascido por causa de uma deficiência congênita homozigótica. A púrpura fulminans tem sido relatada, também, em pessoas com ingestão abusiva de álcool e tratamento com paracetamol.

A apresentação clínica inicial consiste no aparecimento de petéquias e equimoses, com ou sem edema. A periferia da lesão pode estar hiperemiada e a região central com a presença de bolhas hemorrágicas e necrose da pele.

O quadro histopatológico é de trombose e infarto hemorrágico dos capilares e vênulas da derme. As artérias e arteríolas são poupadas. O trombo é composto de fibrina, plaquetas ou a mistura de ambos.

A patogênese que apresenta, atualmente, uma grande concordância é a trombose provocada pela deficiência de proteína C e S. A púrpura fulminans neonatal está associada com a deficiência congênita grave de uma ou outra proteína inibidora da coagulação. Na CID esses inibidores são consumidos. Numerosos casos ocorrem após a administração de anticoagulante oral e a incidência é maior nos três primeiros dias da ingestão da droga, já que as proteínas C e S têm uma meia vida muito curta comparada com os fatores pró-coagulantes dependentes da vitamina K. Vinte e quatro horas após a administração do anticoagulante oral, os níveis de proteína C e S podem estar menos de 10% do normal, enquanto os fatores dependentes da vitamina K ainda estão acima de 50% dos valores de referência. O problema é acentuado nos indivíduos heterozigotos para a deficiência de proteína C.

Pelas razões apresentadas antes, devemos, sempre que formos anticoagular um paciente com varfarina, acrescentar ao esquema de anticoagulação a heparina, por um período de 5 a 10 dias ou até o INR estar bem ajustado.

PÚRPURA PSICOGÊNICA

É uma síndrome caracterizada por equimoses recorrentes e espontâneas em pacientes sem alteração da hemostasia. Foi descrita, pela primeira vez, por Gardner e Diamond em 1955 e está relacionada com uma sensibilização autoeritrocitária.

Há evidências para uma relação com causas psicossomáticas e pode existir uma história de disfunção psiquiátrica, frequentemente relacionada com trauma emocional importante. A maioria das pessoas acometidas é do sexo feminino, mais comumente nas adolescentes e adultas jovens. A remissão e exacerbação são imprevisíveis e estão associadas ao estado emocional.

TELEANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITÁRIA

A *teleangiectasia hemorrágica hereditária,* também conhecida como *síndrome de Rendu-Osler-Weber*, é uma doença familiar de teleangiectasia proliferativa na pele, mucosas e órgãos sólidos. As teleangiectasias discretas podem acarretar apenas um problema estético, mas, quando as pessoas apresentam lesões maiores, pode ocorrer perda sanguínea crônica, múltiplos êmbolos, hipoxemia, disfunção hepática ou insuficiência cardíaca. Essa síndrome tem sido relatada em todas as raças, com transmissão autossômica dominante e uma prevalência estimada de 1:50.000.

O mecanismo pelo qual esse defeito genético resulta em teleangiectasia não foi, ainda, bem identificado. A análise ultraestrutural das lesões cutâneas da teleangiectasia sugere a dilatação das vênulas pós-capilares, e é a primeira anormalidade morfológica reconhecida. As vênulas dilatam-se, ficam enroladas e interconectam com as arteríolas através de segmentos capilares. Os segmentos capilares eventualmente desaparecem e, então, ocorre a comunicação direta entre arteríola e vênula. O sangramento ocorre por causa de uma fragilidade mecânica desses vasos.

As lesões cutâneas geralmente aparecem nas pessoas afetadas pela doença com mais frequência a partir dos 40 anos de idade e aumentam com a idade. As lesões medem de 1 a 3 mm de diâmetro e são de um aspecto nitidamente demarcado. As teleangiectasias desaparecem com a pressão e são encontradas com mais frequência na face, lábios, nariz, língua, leito ungueal e mãos. Alguns pacientes têm tão poucas lesões que necessitam de um cuidadoso exame clínico para se perceber as teleangiectasias. O sangramento dessas teleangiectasias cutâneas são incomuns e raramente de importância clínica.

A epistaxe é uma queixa presente em mais de 90% dos pacientes. Esta situação resulta do sangramento de lesões teleangiectásicas da mucosa e do septo nasal. Aproximadamente 1/3 dos pacientes têm sintomas leves que não necessitam de nenhum tratamento, e outro terço tem sintomas moderados que são resolvidos com tratamento ambulatorial. O um terço restante tem sintomas mais graves e frequentemente necessita de internação, transfusão sanguínea, reposição crônica de ferro e cirurgia.

Malformações arteriovenosas pulmonares ocorrem em 5% a 30% dos pacientes com teleangiectasia hemorrágica hereditária. Essas malformações resultam, às vezes, num significante *shunt*, e os pacientes podem desenvolver dispneia, cianose, fadiga e policitemia. Embolia paradoxal pode ocorrer e resulta em ataque isquêmico transitório ou abscesso cerebral. Essas lesões podem, também, sangrar e provocar hemoptise e hemotórax.

Aproximadamente 20% dos pacientes com teleangiectasia hemorrágica hereditária desenvolvem uma significante hemorragia alta ou baixa do trato gastrintestinal. Aproximadamente 40% dos episódios de hemorragia ocorrem por lesões no trato gastrintestinal superior, 10% ocorrem no colo e a metade fica indeterminada após avaliação. Diferentemente da epistaxe, a regressão espontânea da hemorragia gastrintestinal é rara e a progressão ou o sangramento crônico intermitente é a norma.

As manifestações neurológicas resultam das malformações arteriovenosas pulmonares em dois terços dos casos e os sintomas restantes são o resultado de teleangiectasias cerebrovasculares, malformações arteriovenosas, aneurismas e hemangiomas cavernosos. Os sintomas são causados por hemorragia ou paraparesia local.

PÚRPURA DE HENOCH-SCHÖNLEIN

A púrpura de Henoch-Schönlein é uma síndrome com quadro de dor em cólica abdominal, nefrite, artrite e púrpura palpável. Essa doença ocorre primariamente em crianças, com o pico de incidência entre a idade de 4 e 11 anos. Parece ter uma variação sazonal e a literatura relata uma incidência maior no inverno.

A biópsia da derme superficial e do intestino mostra uma vasculite aguda das arteríolas pré-capilares e das vênulas pós-capilares. Nos pacientes com envolvimento renal é descrita uma vasculite proliferativa necrotizante. Imunocomplexos circulantes, contendo IgA, são encontrados em 70% dos pacientes logo após o início da púrpura, seguido pelo aparecimento de imunocomplexos de complemento IgA, IgM e IgG no decorrer da doença.

O início dos sintomas é geralmente agudo, com febre e púrpura palpável envolvendo as extremidades e as nádegas. As lesões purpúricas são simétricas e mais abundantes em torno dos joelhos, tornozelos e cotovelos. Uma oligoartritre transitória compromete as grandes articulações em cerca de 40% dos casos, e a dor é frequentemente fora de proporção em relação com os achados clínicos. As alterações renais mais importantes são a proteinúria e a hematúria. As anormalidades renais são geralmente transitórias nas crianças mais jovens, mas de 10% a 20% das crianças mais velhas e dos adultos têm uma doença renal progressiva.

Dor abdominal difusa em cólica ocorre em mais de 1/3 dos casos e pode surgir antes do aparecimento da púrpura. A dor abdominal pode ser intensa e suficiente para sugerir um abdome agudo.

Tratamento sintomático é o que deve ser feito nos casos leves. Corticosteroides podem ser usados nas formas muito sintomáticas, principalmente quando da presença de dores articulares ou abdominais.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Giordano P, Nigro A, Lenato GM, et al. Screening for children from families with Rendu-Osler-Weber disease: from geneticist to clinican. J Thrmb Haemost. 2006;4(6):1237-45.
2. Lourenço DM, Morelli V. Púrpuras Não Trombocitopênicas. In: Figueiredo MS, Kerbauy J, Lourenço DM. Hematologia – Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar da UNIFESP-EPM. São Paulo: Editora Manole, 2011. p.281-8.
3. Lourenço DM. Lourenço DM. Defeitos da Hemostasia Primária. Defeitos da Hemostasia de Origem Vascular. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Tratado de Hematologia. São Paulo: Atheneu, 2013. p.593-5.
4. Lowe GDO. Vascular Disease and Vasculitis. In: Ratnoff O, Forbes CD. Disorders of Hemostasis. Orlando: Grune & Stratton, 1984. p.527-47.
5. Philips MD, Levy ML. Vascular Purpura and Diseaswes of Blood vessels. In: Loscalzo J, Schafer Al. Thrombosis and Hemorrage. 2.ed. Baltmore: Wlliams & Wilkins, 1998. p.945-61.

57

capítulo

Fernando Pretti

Trombocitopenias

INTRODUÇÃO

O número de plaquetas em pessoas normais varia de 150.000/mm^3 a 400.000/mm^3. Embora o significado de uma intensa trombocitopenia seja indiscutível, a importância de uma trombocitopenia nos limites inferiores do normal, entre 100.000/mm^3 a 150.000/mm^3, é incerto. Algumas contagens plaquetárias nessa faixa podem não ter significado clínico, mas outras vezes podem representar uma manifestação inicial de alguma doença ainda não reconhecida. O número de plaquetas circulantes é a combinação da taxa de produção, da destruição e da taxa de sequestro pelo baço. A meia vida plaquetária é de 7 a 10 dias e há um *pool* de plaquetas no baço, de aproximadamente 30% do volume plaquetário de uma pessoa normal, e isso determina um equilíbrio dinâmico com as plaquetas circulantes.

A contagem normal de plaquetas está muito além do número de plaquetas necessário para a hemostasia. Com as plaquetas abaixo de 100.000/mm^3, habitualmente não costuma ocorrer sangramento espontâneo até um limite de 5.000 plaquetas/mm^3 Observações clínicas em pacientes recebendo quimioterapia ou sendo tratados de anemia aplástica indicam que um nível de 10.000 plaquetas/mm^3 é suficiente para minimizar o risco de sangramento espontâneo; e hemorragia após trauma ou cirurgia, geralmente, não ocorre se as plaquetas estiverem acima de 50.000/mm^3. No entanto, não há um limite absoluto para correlacionar o sangramento espontâneo consequente à trombocitopenia, e isso pode acontecer com a contagem de plaquetas mais altas quando associada à febre, sepse, anemia intensa, presença de outros defeitos hemostáticos ou distúrbios funcionais plaquetários genéticos ou provocados por medicamentos.

CAUSAS DE TROMBOCITOPENIA

Na prática clínica, as trombocitopenias podem ser classificadas nas formas imunológicas e não imunológicas.

Trombocitopenias provocadas por anticorpos (imunológicas)

Trombocitopenia imune

A púrpura trombocitopênica imunológica (PTI) ou autoimune (PTA) é uma doença causada por anticorpos contra as plaquetas. A PTI é caracterizada por uma contagem de plaquetas inferior a 100.000/mm^3, com série vermelha e série branca normais, com um esfregaço sanguíneo mostrando apenas diminuição do número de plaquetas e ausência de esplenomegalia. Além disso, um diagnóstico de PTI requer ausência de história familiar de trombocitopenia e o não uso de medicamentos que podem causar diminuição das plaquetas. Como não existe nenhum exame específico para o diagnóstico de PTI, o diagnóstico é por exclusão. A PTI pode ocorrer em qualquer idade, sexo e pode apresentar-se tanto com hemorragia espontânea de mucosas como uma trombocitopenia assintomática inexplicável. A medula óssea é normal, exceto por uma hiperplasia megacariocítica compensatória, portanto o mielograma raramente é necessário para o diagnóstico. Embora a pesquisa de anticorpos antiplaquetas seja disponível, não apresenta sensibilidade e nem especificidade e raramente é útil para o diagnóstico.

Em aproximadamente metade dos pacientes que são considerados portadores de PTI, os anticorpos antiplaquetas são secundários a outras doenças, como, por exemplo, doenças autoimunes, como: Lúpus eritematoso sistêmico, doenças linfoproliferativas (leucemia linfocítica crônica), imunodeficiências, mielodisplasia, hepatite C, HIV ou *Helicobacter pylori*.

Nos adultos, a PTI, geralmente, é uma doença crônica; somente 15% dos pacientes remitem dentro de um ano do início. Ao contrário, na infância, a PTI frequentemente é precedida de um quadro febril e mais de 70% remitem com seis meses, independentemente do tratamento; somente de 5% a 10% desenvolvem a doença crônica. O objetivo do tratamento da PTI é manter uma contagem de plaquetas segura, mas não

necessariamente dentro do normal, com o mínimo de toxicidade do medicamento. Como o sangramento, geralmente, é mínimo ou ausente com as plaquetas até mesmo abaixo de 30.000/mm^3, os pacientes assintomáticos, com o número de plaquetas maior que 30.000/mm^3, podem ser seguidos sem nenhum tratamento. No entanto, a manutenção de um número de plaquetas hemostaticamente seguro pode necessitar da administração crônica de corticosteroide (ex.: na dose de 10 mg de prednisona por dia), esplenectomia ou imunossupressão com rituximabe, azatioprina ou ciclofosfamida. Para os pacientes refratários à terapia, o tratamento com agonistas de receptores da trombopoetina deve ser considerado. Quando os pacientes com PTI apresentam uma intensa trombocitopenia (< 5.000/mm^3) e/ou um sangramento maior com risco de vida, o tratamento pode ser realizado com altas doses de corticosteroides e/ou imunoglobulina intravenosa. As transfusões de plaquetas são, geralmente, incapazes de aumentar as plaquetas na PTI grave, por causa da rápida fixação do anticorpo às plaquetas transfundidas, mas a associação com imunoglobulina intravenosa pode aumentar as plaquetas em alguns pacientes.

Trombocitopenia aloimune

A trombocitopenia aloimune é o resultado da sensibilização aos aloantígenos plaquetários após transfusão de plaquetas ou hemácias aos pacientes que não apresentam estes antígenos (púrpura pós-transfusional, PPT) ou sensibilização materna a antígenos plaquetários estranhos durante a gravidez, de uma forma similar à incompatibilidade que ocorre ao Rh (trombocitopenia neonatal aloimune). A púrpura pós-transfusional causa uma profunda trombocitopenia de 7 a 10 dias após a transfusão e pode ser tratada com imunoglobulina intravenosa ou ex-sanguíneo transfusão. A trombocitopenia neonatal aloimune causa uma intensa trombocitopenia e sangramento nos recém-nascidos e é tratada com transfusão de plaquetas, corticosteroides e imunoglobulina

Trombocitopenia induzida por drogas

Os anticorpos antiplaquetas induzidos pela sensibilização a drogas podem causar uma destruição plaquetária aguda e essa condição deve ser considerada no diagnóstico diferencial das trombocitopenias. Embora haja uma longa lista de drogas relatadas que causam trombocitopenia, as selecionadas na Tabela 57.1 são as mais relevantes.

Em geral, a droga se liga a um anticorpo no plasma e, depois, esse complexo fixa-se às glicoproteínas da membrana plaquetária. As drogas, como as penicilinas, atuam como haptenos, com ligação covalente às glicoproteínas da membrana plaquetária; ou outras drogas, como os sais de ouro, levodopa e procainamida, induzem a formação de um neo-antígeno específico para as plaquetas, que pode, clinicamente, simular uma PTI. O tratamento para a trombocitopenia, com hemorragia, induzida por drogas, consiste na retirada do medicamento, transfusão de plaquetas, corticosteroides e imunoglobulina, semelhante ao tratamento da PTI.

Tabela 57.1 Drogas associadas à indução de trombocitopenia.

Abciximabe	Haloperidol
Acetaminofeno	Ibuprofeno
Ácido valproico	Irinotecano
A metil dopa	Naproxeno
Amiodarona	Piperacilina
Ampicilina	Quinidina
Carbamazepina	Ranitidina
Cimetidina	Rifampicina
Clortalidona	Sinvastatina
Clortiazida	Sulfisoxazol
Eptifibatide	Tirofibrana
Fenitoína	Trimetropim-sulfametoxazol
Furosemide	Vancomicina

Fonte: Marco Antonio Zago; *et al.*, 2013.

A trombocitopenia induzida pela heparina (HIT) é um caso especial de uma droga induzindo à trombocitopenia, uma vez que está associada com trombose arterial e venosa, mais que um quadro de hemorragia. Dependendo da população clínica em risco, a HIT ocorre em aproximadamente 1% a 5% dos pacientes que recebem heparina não fracionada durante 5 a 10 dias. Isto é devido à formação de anticorpos contra o complexo heparina com o fator 4 plaquetário existente nos grânulos α das plaquetas. A HIT é um diagnóstico clínico com critério que inclui uma queda aguda na contagem das plaquetas de 50% ou mais de 150.000/mm^3; o diagnóstico é confirmado por um teste específico para os anticorpos fixados à heparina. Quando a HIT for uma possibilidade, toda a administração da heparina deve ser suspensa e uma alternativa de anticoagulação é o uso de inibidores da trombina.

Trombocitopenia não imune

O mecanismo não imune pode provocar trombocitopenia por diminuição na produção de plaquetas pela medula óssea, por diminuição da meia-vida plaquetária das plaquetas circulantes ou por aumento do sequestro esplênico nas esplenomegalias.

Trombocitopenias hereditárias

A trombocitopenia hereditária pode aparecer na infância em associação com doenças do desenvolvimento. Entretanto, o diagnóstico é facilmente negligenciado em adultos com trombocitopenia. A trombocitopenia hereditária frequente-

mente apresenta uma macrotrombocitopenia, como na síndrome de Bernard-Soulier. Uma exceção é a síndrome de Wiskott-Aldrich e suas trombocitopenias variantes ligadas ao sexo, que são caracterizadas por plaquetas pequenas e raros casos publicados de trombocitopenias familiares isoladas com tamanho normal das plaquetas.

Trombocitopenias com meia-vida plaquetária diminuída

Essa situação ocorre na sepse, coagulação intravascular disseminada (CID), púrpura trombocitopênica trombótica, síndrome hemolítico-urêmica, pré-eclâmpsia, cirurgia extracorpórea e hemangiomas gigantes. A trombocitopenia, nesses casos, se resolve tratando a doença de base e a transfusão de plaquetas raramente é necessária.

Trombocitopenia causada por uma diminuição na produção

Essa trombocitopenia é causada por uma diminuição na produção de plaquetas pela medula óssea, em doenças como as leucemias agudas, anemia aplástica, mielodisplasias, anemias mielotísicas por infiltração (carcinoma, linfoma, mieloma), fibrose da medula, assim como supressão da medula óssea por quimioterapia, radiação, toxicidade por etanol e infecções (HIV, sarampo, citomegalovírus, varicela). Essas doenças devem ser percebidas rapidamente pela história, exame físico e um cuidadoso exame do sangue periférico. Quando a causa da diminuição das plaquetas não puder ser rapidamente revertida, a necessidade de transfusão de plaquetas, a longo prazo, é frequentemente considerada, mas esse tipo de tratamento pode produzir aloanticorpos e provocar uma refratariedade à transfusão de plaquetas. Para minimizar o risco de refratariedade à transfusão, um limite de 10.000 plaquetas/mm^3 tem sido estabelecido como suficiente para indicar a transfusão de plaquetas profilática para prevenir hemorragias espontâneas nos pacientes tratados com quimioterapia, pacientes submetidos a transplante de medula óssea ou no seguimento de anemia aplástica.

Trombocitopenias secundárias ao sequestro nas esplenomegalias

Aproximadamente 30% da massa plaquetária circulante está normalmente no baço, mas uma percentagem maior pode ser sequestrada quando o baço está aumentado. O número de plaquetas nessa situação geralmente está entre 40.000/mm^3 a 50.000/mm^3, mas hemorragia devido à trombocitopenia isolada não é frequente.

Pseudotrombocitopenia

A aglutinação das plaquetas numa amostra de sangue colhida com EDTA pode causar uma falsa trombocitopenia, quando a contagem das plaquetas é feita por contadores automatizados. Esse artefato *in vitro* é causado por anticorpos anti-plaquetas aglutinantes. Isso pode ser distinguido da verdadeira trombocitopenia ao examinar o esfregaço sanguíneo em que se observa muitos agregados plaquetários em número incompatível com a contagem eletrônica. Sugerimos passar o sangue no aparelho imediatamente após a coleta em tubo de polipropileno, sem anticoagulante. A prevalência da pseudotrombocitopenia é de 0,11% ou mais nos pacientes com plaquetas abaixo de 100.000/mm^3.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Arepally GM, Ortel TL. Clinical Pratice. Heparin-induced thrombocytopenia. N Engl J Med. 2006;355:809-17.
2. Aster RH, Curtis BR, MacFarland JG, et al. Grug-induced immune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. J Thromb Haemost. 2009;97:911-8.
3. Bennett JS. Overwiev of acquired and inherited clinical platelet disorders. In: Marder VJ. Hemostasis and Thombosis. 6.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2013. p.751-6.
4. Lourenço DM. Trombocitopenias. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Tratado de Hematologia. São Paulo: Atheneu, 2013. p.597-603.
5. Marco Antonio Zago; Roberto Passeto Falcão; Ricardo Pasquini. Tratado de Hematologia 2013. Atheneu, 600.
6. Morelli VM, Lourenço DM. Trombocitopenias. In: Figueiredo MS, Kerbauy J, Lourenço DM. Hematologia – Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar da UNIFESP-EPM. São Paulo: Editora Manole, 2011. p.249-58.
7. Pegels JG, Bruynes EC, Engelfriet CP, et al. Pseudothrombocytopenia: na immunologic study on platelet antibodies dependent on ethylene diamine tetra-acetate. Blood. 1982;59:157-61.
8. Provan D, Stasi R, Newland AC, et al. International consensus reporto n the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. Blood. 2010;115:168-86.
9. Reese JA, Li X, Hauben M, et al. Identifying drugs that cause acute thrombocytopenia: na analysis using 3 distinct methods. Blood. 2010;116:2127-33.
10. Slichter SJ. Relationship between platelet count and bleeding risk in thrombocytopenia patients. Transfus Med Rev. 2004;18:153-67.

58

capítulo

Fernando Pretti

Defeitos Funcionais das Plaquetas

INTRODUÇÃO

Os pacientes com distúrbios funcionais plaquetários são caracterizados por apresentar manifestações hemorrágicas cutaneomucosas persistentes. A definição dos mecanismos plaquetários anormais em tais pacientes tem fornecido inestimável compreensão dos aspectos básicos da fisiologia plaquetária e da hemostasia. Após injúria do vaso sanguíneo, as plaquetas aderem ao subendotélio exposto por um processo de adesão que envolve a interação de uma proteína plasmática, o fator de von *Willebrand (FVW)*, e uma proteína específica da superfície da plaqueta, a *glicoproteína Ib (GPIb)*. A adesão é seguida pelo recrutamento de outras plaquetas, que formam grumos, processo esse chamado de agregação. A interação das plaquetas com um agonista (ADP, adrenalina, colágeno etc.) inicia a produção ou liberação de várias moléculas intracelulares, incluindo íons de Ca^{++}, tromboxane A_2 (TxA_2) e AMPc. Esses induzem ou modulam as várias respostas da mobilização do Ca^{++} plaquetário, agregação, secreção e liberação de ácido araquidônico.

CLASSIFICAÇÃO E ASPECTOS CLÍNICOS

Os defeitos genéticos da função plaquetária são caracterizados por manifestações hemorrágicas de intensidade muito variável de pessoa para pessoa e de diferentes defeitos das plaquetas. As manifestações são principalmente cutaneomucosas, e hemorragias leves ou intensas podem ocorrer após trauma ou cirurgia. A contagem e a morfologia das plaquetas são normais na maioria das vezes. Alguns pacientes, porém não todos, têm o tempo de sangramento prolongado, mas a agregação plaquetária é o exame mais indicado para o diagnóstico desses defeitos funcionais. No estudo realizado com plasma rico em plaquetas, a agregação normal em resposta aos agonistas, como ADP e adrenalina, consiste em duas fases: a primeira onda de agregação (agregação primária), que resulta da interação do agonista com os receptores específicos das plaquetas, e a segunda onda, relacionada com a liberação dos conteúdos dos grânulos densos e a produção de TxA_2. Portanto, os pacientes com defeito na reação de liberação do conteúdo dos grânulos densos ou defeito na produção de TxA_2 geralmente demonstram uma primeira onda, mas não a segunda onda de agregação.

Embora esteja claro que a disfunção plaquetária pode ocorrer por diversos mecanismos, o mecanismo molecular específico da alteração da função permanece desconhecido em muitos pacientes com distúrbio genético da função plaquetária. As disfunções plaquetárias que merecem ser mencionadas podem ocorrer por um *defeito na interação vaso-plaqueta*, onde a adesão das plaquetas ao subendotélio é anormal. Duas doenças desse grupo são a Doença de von Willebrand, causada por uma anormalidade ou deficiência do fator de von Willebrand, e a síndrome de Bernard-Soulier, na qual as plaquetas são deficientes em glicoproteína (GP) Ib-IX-V e, consequentemente, a ligação do fator de von Willebrand (FVW) às plaquetas é anormal. *Defeitos da interação plaqueta-plaqueta* (agregação) ocorrem por deficiência grave de fibrinogênio plasmático (afibrinogenemia congênita) ou por um defeito quantitativo ou qualitativo das glicoproteínas IIb-IIIa, o que caracteriza uma doença hemorrágica grave denominada Tromboastenia de Glanzmann. Os pacientes com *defeitos na secreção plaquetária* pertencem a um conjunto heterogêneo de disfunção plaquetária, que foi agrupado, mais por conveniência de classificação do que por um conhecimento da base das alterações específicas das plaquetas. A principal característica em comum desses pacientes é a falta de resposta à agregação e a diminuição da reação de liberação do conteúdo dos grânulos após ativação do plasma rico em plaquetas com ADP, adrenalina, TxA_2 e colágeno. A segunda onda de agregação está, geralmente, ausente ou diminuída, enquanto a primeira onda está presente. Esta última disfunção é, de longe, a mais frequente, com exceção da doença de von Willebrand, cuja prevalência é estimada entre 1% e 3% da população. Um pequeno grupo desses pacientes tem uma deficiência de grânulos densos (doença do *pool* plaquetário).

DEFEITO DE ADESÃO PLAQUETÁRIA

Síndrome de Bernard-Soulier

A síndrome de Bernard-Soulier (SBS) é um distúrbio hemostático raro caracterizado por um tempo de sangramen-

to prolongado, plaquetas muito grandes e trombocitopenia. As plaquetas com SBS não aderem ao fator de von Willebrand (FVW) em decorrência da deficiência ou disfunção das glicoproteínas (GP) plaquetárias Ib-IX e V. Após a lesão do endotélio vascular, as plaquetas circulantes podem aderir ao tecido conjuntivo do subendotélio exposto, tais como o colágeno e a fibronectina. Entretanto, em razão do grande cisalhamento presente nas arteríolas e na microcirculação, a adesão das plaquetas requer a presença adicional do FVW.

A SBS apresenta, na infância, equimoses, epistaxes e hemorragia gengival. Posteriormente aparecem menorragia, hemorragia gastrintestinal e sangramento pós-trauma. Embora a gravidade da hemorragia seja variável, pode ser suficiente para necessitar de transfusão e suspensão da menstruação. Em alguns pacientes, a intensidade da hemorragia pode diminuir com o tempo.

O tempo de sangramento é bastante aumentado para mais que 20 minutos. A maioria dos pacientes apresenta algum grau de trombocitopenia, e números maiores que 20.000 plaquetas/mm^3 foram relatados. No entanto, o número de plaquetas varia dentro da mesma família e mesmo no próprio paciente. As plaquetas são grandes quando examinadas no sangue periférico; de 30% a 80% têm o diâmetro > 3,5 μm, e ocasionalmente as plaquetas medem de 20 a 30 μm de diâmetro. A base molecular para explicar a macrotrombocitopenia não é conhecida. As séries branca e vermelha são normais na SBS. O exame que distingue a SBS das plaquetas normais é a ausência de agregação plaquetária com a ristocetina, que ocorre na SBS, mesmo na presença do FVW. A agregação é normal com ADP, colágeno e adrenalina. A SBS é uma doença autossômica recessiva. Na maioria das vezes, o complexo GPIb-IX-V não está presente na superfície das plaquetas na SBS, mas em poucos casos um resíduo de GPIb-IX-V pode ser detectado.

O tratamento da hemorragia em pacientes com SBS geralmente necessita de transfusão de plaquetas. O controle hormonal da menstruação pode ser útil no controle do sangramento. A esplenectomia foi uma tentativa para aumentar o número de plaquetas, mas o resultado do aumento foi apenas transitório e não houve melhora na função plaquetária. O corticosteroide não é benéfico na SBS. Os antifibrinolíticos podem ser usados associados a outros tratamentos.

■ DEFEITO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Trombastenia de Glanzmann

A trombastenia de Glanzmann foi descrita por ele em 1918; é uma doença hemorrágica rara, caracterizada por um tempo de sangramento prolongado, um número normal de plaquetas e uma ausência de plaquetas agregadas no esfregaço sanguíneo. As plaquetas das pessoas com trombastenia de Glanzmann são incapazes de agregar por causa da deficiência da GPIIb-IIIa.

A agregação plaquetária é essencial para a formação do tampão plaquetário hemostático e, ao contrário da adesão plaquetária, a agregação está ausente na trombastenia de Glanzmann com os agonistas trombina, colágeno e ADP. Nas plaquetas normais, a GPIIb-IIIa ligada ao fibrinogênio ou ao FVW atraem as plaquetas adjacentes para formar um tampão oclusivo. A estimulação plaquetária também permite a interação da GPIIb-IIIa com filamentos de actina, promovendo a conexão entre forças de contração do citoesqueleto e a fibrina, resultando na retração do coágulo.

A Trombastenia de Glanzmann apresenta-se com hemorragia cutaneomucosa durante o período neonatal ou na infância. Petéquias espontâneas são raras. A epistaxe é um tipo de sangramento frequente, especialmente durante a infância, assim como sangramento gengival e menorragia. O sangramento na menarca pode ser grave e precisar de transfusão, e o parto representa um risco de hemorragia grave. Hemorragia digestiva e hematúria também podem ocorrer, mas hematomas e hemartroses são raros. Pode ocorrer sangramento grave após trauma ou cirurgia. A gravidade da hemorragia na trombastenia não é previsível, mesmo dentro da mesma família, e não há correlação com o grau de deficiência da GPIIb-IIIa. A contagem de plaquetas é normal, assim como o aspecto morfológico no esfregaço sanguíneo, mas não observamos plaquetas agregadas. O tempo de sangramento é significativamente prolongado. O diagnóstico de trombastenia começa com o estudo da agregação plaquetária. A agregação é ausente quando se usa como agonistas o ADP e a adrenalina e a retração do coágulo está ausente ou reduzida. O tempo de protrombina e o PTTA são normais. No esfregaço sanguíneo observamos uma ausência de plaquetas agregadas.

A trombastenia de Glanzmann é uma doença autossômica recessiva e mais frequente em populações onde a consanguinidade é comum. O recurso terapêutico na trombastenia de Glanzmann é a transfusão de plaquetas. Plaquetas compatíveis devem ser consideradas devido à aloimunização que pode ocorrer em decorrência da grande necessidade de plaquetas durante a vida do paciente. O contraceptivo oral é uma alternativa para as mulheres com intenso sangramento menstrual. Tratamento preventivo da cavidade oral é essencial para minimizar o sangramento gengival e os antifibrinolíticos, juntamente com a transfusão de plaquetas, podem ser úteis para controlar o sangramento nas exodontias. O corticosteroide não apresenta eficácia na hemorragia da trombastenia. O fator VIIa recombinante tem mostrado eficácia no tratamento de episódios hemorrágicos, principalmente naqueles pacientes que desenvolveram anticorpos contra as plaquetas.

■ DEFEITO DE SECREÇÃO PLAQUETÁRIA

As plaquetas contêm quatro tipos de grânulos: grânulos densos contendo ADP, ATP, cálcio, serotonina e pirofosfato; grânulos-α, que contêm uma variedade de proteínas, algumas derivadas do plasma, outras sintetizadas dos megacariócitos; lisossomas contendo hidrolases ácidas; e microperoxisomas contendo a peroxidase ativa. Após a ativação plaquetária, o conteúdo desses grânulos é expulso por um processo chamado de secreção plaquetária ou reação de liberação plaquetária. Essas alterações plaquetárias são heterogêneas e, geralmente, apresentam uma diminuição na agregação plaquetária e ausência da segunda onda de agregação quando as plaquetas são

estimuladas com ADP e adrenalina. Isso pode ser devido a uma diminuição do número de grânulos, redução do conteúdo dos grânulos ou um distúrbio no mecanismo de secreção dos grânulos.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Alamelu J, Liesner R. Modern management of severe platelet function disorders. Br J Haematol. 2010;1949:813-23.
2. Bennett JS, Rao AK. Inherited Disorders of Platelet function. Hemostasis and Thrombosis. 6.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2013. p.805-19.
3. Berndt MC, Andrews RK. Bernard-Soulier syndrome. Haematologica. 2011;96:355-9.
4. Kerbauy J, Lourenço DM. Hematologia – Guia de Medicina Ambulatorial e Hospitalar da UNIFESP-EPM. São Paulo: Editora Manole, 2011. p.281-8.
5. Lourenço DM, Morelli VM. Púrpuras não Trombocitopênicas. Figueiredo MS,
6. Lourenço DM. Defeitos Funcionais das Plaquetas. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Tratado de Hematologia. São Paulo: Atheneu, 2013. p.621-4.
7. Nurden AT, Fiore M, Nurden P, et al. Glazmann thrombasthenia: a rewiev of ITGA2B and ITGB3 defects with emphasis on varinya, phenotypic variability, and mouse models. Blood. 2011;118:5996-6005.
8. Rao AK. Inherited defects in platelet signaling mechanisms. Sem Thromb Hemost. 2004;30:525-35.

59

capítulo

Fernando Pretti

Hemofilias

INTRODUÇÃO

A hemofilia compreende uma categoria de distúrbios hemorrágicos hereditários decorrentes da deficiência congênita de algumas proteínas envolvidas na coagulação sanguínea. A deficiência mais frequente envolve o fator VIII, responsável pela hemofilia A, e a outra deficiência menos frequente é a do fator IX, associada à hemofilia B. Ambas são recessivas e estão ligadas ao cromossomo X, estando presentes quase exclusivamente no sexo masculino. A deficiência do fator XI é chamada por alguns autores de hemofilia C e é transmitida por um gene autossômico recessivo. A hemofilia A ocorre entre 80% e 85% dos casos (1 por 5.000 crianças do sexo masculino nascidas) e é 4 a 6 vezes mais frequente que a hemofilia B (1 por 30.000 crianças do sexo masculino nascidas) e 100 vezes mais frequente que a deficiência do fator XI na população geral (1 por 1.000.000 de crianças do sexo masculino nascidas) (Figura 59.1).

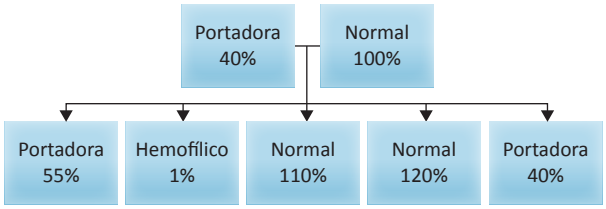


Figura 59.1 Hemofilia – genealogia.

DETECÇÃO DE PORTADORAS E O DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL

A detecção de portadoras deveria ser obrigatória em todas as mulheres com história familiar positiva para hemofilia e que pretendessem engravidar. A atividade do fator VIII ou IX pode ser tão baixa que aumentaria bastante o risco de hemorragia durante uma cirurgia ou após um trauma maior. Uma análise direta da mutação do gene para a inversão do intron 22 está recomendada como teste de primeira linha para a detecção de portadoras em familiares com hemofilia A. A amplificação do DNA através da reação da cadeia de polimerase e a pesquisa da mutação específica dentro da codificação sequencial do gene do fator VIII é teoricamente possível, mas extremamente trabalhosa. Essa técnica oferece mais de 99,9% de precisão, mas somente quando um paciente do sexo masculino afetado e demais membros da família estão disponíveis para exame. A detecção de portadoras também pode ser efetuada através da relação entre a atividade do fator VIII coagulante e o nível do fator de von Willebrand (vWF). Relação menor que 0,5 pode identificar de 91% a 99% das portadoras de hemofilia. Aproximadamente 30% de todas as hemofilias A são causadas por mutações genéticas espontâneas.

Porque o gene do fator IX é aproximadamente um terço do tamanho do fator VIII, o estudo do DNA do fator IX, para a detecção da mutação genética em portadoras e nos homens, é muito mais fácil para a identificação. Mais de 300 mutações diferentes já foram relatadas na literatura. Somente 60% a 70% das portadoras de hemofilia B podem ser detectadas pela dosagem reduzida da atividade do fator IX. Assim como a hemofilia A, também aproximadamente 30% dos casos estão associados com mutação espontânea, sem nenhum membro da família estar afetado.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A hemofilia é caracterizada por um sangramento excessivo no interior de vários tecidos do corpo, principalmente hemorragias musculares (hematomas) e nas articulações (hemartroses). A doença pode ser classificada como leve, moderada ou grave (Tabela 59.1).

Os pacientes hemofílicos graves apresentam hemorragias espontâneas com bastante frequência, sem trauma ou qualquer causa aparente. A recorrência das hemartroses provoca uma artropatia crônica, levando geralmente a algum grau de incapacidade física. Hematomas espontâneos também são frequentes nessa forma de hemofilia. Com exceção da hemorragia craniana, a morte súbita provocada pela hemorragia é rara.

Os hemofílicos moderados podem apresentar hematomas ocasionais e as hemartroses geralmente estão associadas com algum tipo de trauma.

Tabela 59.1 Classificação da hemofilia.

Classificação	Fator VIII	Quadro clínico
Grave	< 1%	Hemorragias espontâneas desde a infância
		Hemartroses espontâneas
Moderada	1%-5%	Hemorragias secundárias a traumas ou cirurgias
		Hemartroses espontâneas ocasionais
Leve	6%-30%	Hemorragias secundárias a traumas ou cirurgias

Os pacientes hemofílicos leves apresentam sangramento com muito menos frequência que os graves e moderados. Essa forma pode cursar sem diagnóstico por muitos anos e poderá despertar a suspeita após um sangramento além do normal durante ou depois de uma cirurgia, seguido de um trauma após queda ou a prática de esportes.

Entre 2% e 8% das crianças hemofílicas apresentam hemorragia intracraniana e hematoma do couro cabeludo durante o período perinatal. Essas complicações estão associadas com um trabalho de parto difícil e prolongado, o uso de vácuo e fórceps para facilitar o parto, a presença de uma desproporção céfalo-pélvica e parto precipitado. A cesariana não elimina os riscos de hemorragia.

Como as portadoras têm menos fator VIII ou IX em decorrência da redução da síntese desses fatores, algumas pacientes podem apresentar sangramento significativo após trauma ou cirurgia. Portanto está indicada a dosagem dos fatores VIII ou IX nas mães de crianças hemofílicas.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A identificação e o diagnóstico da hemofilia A ou B é facilitada quando outros membros da família já apresentam a hemofilia. O grau de gravidade da hemofilia é, geralmente, similar em todos os membros afetados da família. Vale a pena ressaltar que aproximadamente 30% de todas as hemofilias são devidas a mutações espontâneas, em famílias sem história de defeitos da coagulação.

Os pacientes com hemofilia grave não apresentam dificuldade no diagnóstico, já que a clínica é exuberante e, como apresentam menos de 1% do fator, o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (PTTA) apresenta-se bastante prolongado. Também os hemofílicos moderados (1% a 5% do fator) apresentam um PTTA prolongado o suficiente para a suspeita diagnóstica na investigação inicial.

A dificuldade para o diagnóstico reside em alguns pacientes hemofílicos leves, já que o valor dos fatores VIII ou IX pode variar de 6% a 30%. É fácil entender que o plasma de um hemofílico com 6% do fator vai prolongar o PTTA o suficiente para suspeitar-se da doença. No entanto, aquele que apresentar 30% do fator VIII ou IX vai depender muito da sensibilidade do reagente, bem como do controle interno do laboratório para estabelecer o limite máximo de tempo do PTTA. Uma boa prática é selecionar um plasma de calibração com o nível conhecido do fator VIII e, por meio de algumas diluições, estabelecer o valor de referência do PTTA.

Outro bom exame para ampliar a investigação é o teste da mistura, ou seja, faz-se uma mistura (50%) do plasma do paciente com um plasma normal. O PTTA é corrigido quando há deficiência de fator da coagulação e permanece prolongado quando da presença de um inibidor.

Embora o Tempo de Protrombina (TP) não esteja alterado nos hemofílicos, sempre estará indicado para estabelecer-se o diagnóstico diferencial com outras coagulopatias. Uma história familiar positiva para hemofilia, um PTTA prolongado com um TP normal, fala muito a favor do diagnóstico de hemofilia (Quadro 59.1).

A confirmação diagnóstica, a identificação entre hemofilia A e B e a classificação clínica quanto à gravidade são feitas através da dosagem dos fatores VIII e IX. O fator VIII pode ser dosado por meio de um método funcional de coagulação ou por meio de um exame no qual se usa um substrato cromogênico. O fator IX é avaliado pelo método funcional coagulométrico. Quando houver suspeita de hemofilia em um recém-nascido, filho de uma mãe portadora, o fator VIII ou IX devem ser dosados através do sangue colhido do cordão umbilical logo após o nascimento. Isso evita a necessidade de punção venosa, o que poderia provocar equimoses ou hemorragia importante no recém-nascido. O diagnóstico de hemofilia B no recém-nascido pode ser confundido com uma deficiência de síntese hepática do fator IX, comum no neonato e que pode permanecer até o sexto mês de vida.

Quadro 59.1 Exames na hemofilia.

PTTA	Prolongado
Tempo de protrombina	Normal
Teste da mistura	PTTA corrigido
Fator VIII	Diminuído (hemofilia A)
Fator IX	Diminuído (hemofilia B)

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

O grande diagnóstico diferencial da hemofilia é com a doença de von Willebrand (DVW). O defeito básico da DVW é uma redução na atividade do fator de von Willebrand (FVW). Em outro capítulo falaremos sobre a DVW.

A hemofilia deve ser diferenciada das deficiências dos outros fatores do mecanismo intrínseco da coagulação, tais como: fatores XI, XII, precalicreína e cininogênio de alto peso molecular.

Como o exame principal de triagem para diagnosticar a hemofilia, o PTTA, pode estar prolongado na presença de um inibidor, também as patologias relacionadas, como, por exemplo, o anticoagulante lúpico, devem entrar como diagnóstico diferencial.

TRATAMENTO

A primeira preocupação com o hemofílico é orientar o paciente ou os familiares a não usar certas drogas como o ácido acetil salicílico (AAS), os anti-inflamatórios ou qualquer outra medicação que possa interferir na função plaquetária. O paracetamol é o analgésico indicado, mas devemos tomar cuidado com o seu uso prolongado. O paciente deve ser orientado sobre uma infinidade de analgésicos que possam conter aspirina ou outra droga antiagregante na sua composição. As injeções intramusculares devem ser evitadas, a menos que o paciente esteja recebendo o fator de coagulação. Na vigência de hematomas, hemartoses ou qualquer outro tipo de sangramento, o hemofílico deve receber a reposição de fatores em tempo mais precoce possível.

Diante de uma cirurgia eletiva, deve ser feito um planejamento com antecedência, principalmente com o banco de sangue, para que possa ter estoque de fator VIII ou IX suficiente para uma boa hemostasia no per e pós-operatório (Quadro 59.2).

Quadro 59.2 Fórmula para calcular a dose em bólus para atingir 100% do fator.

Fator VIII: dose em unidades = peso do paciente em kg × elevação percentual requerida para atingir 100% × 0,5
Fator IX: dose em unidades = peso do paciente em kg × elevação percentual requerida para atingir 100% × 1,0

A desmopressina (DDAVP) pode provocar um aumento do fator VIII em pessoas normais e em hemofílicos A leves e moderados. Após a dose de 0,3 mcg/kg/peso, dado intravenosamente ou subcutâneo, o nível do fator VIII aumenta de duas a três vezes acima do seu valor basal, mas não em todos os pacientes com hemofilia A leve ou moderada. Os pacientes com hemofilia A grave não respondem ao DDAVP. O DDAVP também pode ser administrado através de *spray* intranasal na dose de 150 mcg em cada narina para o adulto e 150 mcg em apenas uma narina em crianças com menos de 50 kg.

O tratamento profilático pode ser instituído em alguns pacientes, principalmente quando o próprio hemofílico e os familiares são pessoas esclarecidas. O objetivo da profilaxia é converter um hemofílico grave para um fenótipo moderado e, assim, diminuir ou prevenir hematomas e hemartroses. A profilaxia reduz as artropatias e as hemorragias mais graves, como o sangramento intracranial.

Existem algumas controvérsias a respeito da dose ótima e a frequência das infusões profiláticas, mas um esquema sugere a dose de 20 a 40 UI/kg em dias alternados. Outro esquema terapêutico sugere uma dose menor dos fatores, de 10 a 20 UI/kg em dias alternados.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Figueiredo MS, Kerbauy J, Lourenço DM. Hematologia – Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar da UNIFESP-EPM. São Paulo: Editora Manole, 2011.
2. Kaushansky K, Lichtman LA, Beutler E, et al. Williams Hematology. 8.ed. Philadelphia: McGraw Hill Medical, 2010.
3. Kitchen S, McCraw A, Echenagucia M. Diagnosis of hemophilia and other bleeding disorders. A laboratory manual. 2.ed. World Federation of Hemophilia, 2010.
4. Kitchens CS, Kessler CM, Konkle BA. Consultative Hemostasis and Thrombosis. 3.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013.
5. Lusher JM, McMillan CW. Severe factor VIII and factor IX deficiency in females. Am J Med. 1978;65:637-48.
6. Miesbach W, Alesci S, Geisen C, et al. Association between phenotype and genotype in carriers on haemophilia A. Haemophilia. 2011;17:246-51.
7. Villaça PR, Carneiro JDA, D`Amico EA, et al. Tratado de Hematologia. São Paulo: Editora Atheneu, 2013.
8. White GC 2nd, Rosendaal F, Aledort LM, et al. On behalf of the Factor VIII and Factor IX Subcommittee. Definitions in hemophilia. Recomendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Thromb Haemost. 2001;85:560.

60

capítulo

Fernando Pretti

Doença de Von Willebrand

INTRODUÇÃO

A doença de von Willebrand (DVW) foi descoberta por Erick von Willebrand, um finlandês que investigava uma família residente numa região localizada entre a Suécia e a Finlândia. O propósito era uma menina de 5 anos de idade com uma doença hemorrágica grave; quatro de suas irmãs haviam morrido de hemorragia antes dos 4 anos de idade. O propósito faleceu com a idade de 13 anos no seu quarto período menstrual. Os pais e vários outros parentes de ambos os sexos tinham sintomas hemorrágicos leves, sugerindo uma transmissão genética autossômica. A gravidade do sangramento era variável e alguns indivíduos heterozigotos eram assintomáticos. Os locais mais frequentes de sangramento eram a pele, útero e mucosas, mais que os tecidos profundos. Essas pessoas tinham um tempo de sangramento prolongado, mas apresentavam tempo de coagulação, retração do coágulo e contagem de plaquetas normais. Eric von Willebrand distinguiu esta patologia da hemofilia e da trombastenia de Glanzmann, mas foi incapaz de determinar se o defeito era localizado no sangue, nos vasos ou nas plaquetas.

Considerável progresso foi alcançado para a compreensão da fisiopatologia da DVW. Na década de 1950, foi descoberto que o nível do fator VIII apresentava-se reduzido e a transfusão com plasma de indivíduos normais ou de pacientes com hemofilia A mostravam correção da tendência de sangramento em pacientes com DVW. Essas observações sugeriram que a DVW era causada por um defeito em uma proteína plasmática, agora conhecida como fator de von Willebrand (FVW). Em 1972, o FVW foi purificado, e variantes genéticas do FVW foram identificadas e correlacionadas com diferenças estruturais na molécula do FVW. Com o desenvolvimento dos multímeros por eletroforese em gel, descobriu-se a heterogeneidade na DVW. Em 1985, a estrutura da molécula do FVW foi determinada por sequência proteica e por clonagem do cDNA. Hoje centenas de mutações em muitos subtipos de DVW foram descritas.

A DVW está presente em aproximadamente 1% da população quando os testes laboratoriais são efetuados como triagem em estudo populacional. Somente 1% dessas pessoas é sintomática e a maioria tem manifestações leves e moderadas que não chegam a prejudicar as atividades diárias. Equimoses espontâneas, epistaxes, sangramento em exodontias e menorragia são sintomas frequentes. Na maioria dos casos, o sangramento resulta de uma diminuição do FVW que interage com as plaquetas e o endotélio vascular.

ESTRUTURA E FUNÇÃO DO FVW

O FVW tem duas funções principais: liga-se às plaquetas e ao subendotélio vascular, atuando como uma ponte para iniciar as reações durante a hemostasia primária, e liga-se ao fator VIII na circulação. O FVW é uma glicoproteína multimérica enorme que é sintetizada pelas células endoteliais e pelos megacariócitos. Os grandes multímeros são formados pela polimerização de subunidades que possuem os mesmos sítios de ligação. Esses sítios de ligação fazem com que o FVW seja especialmente bem adequado para atuar como uma ponte entre as plaquetas e outras estruturas dos vasos. A síntese do FVW inclui a formação inicial de um dímero entre as subunidades básicas e subsequente multimerização dos dímeros de uma magnitude maior que 20 milhões de daltons. O FVW sintetizado é secretado continuamente ou é mantido nos grânulos de estoque, tal como os corpos de Weibel-Palade das células endoteliais ou os grânulos α nos megacariócitos. Esses grânulos contêm o FVW de forma grande e mais hemostática do que o liberado em estimulação com agonistas como a trombina e adrenalina. O FVW localizado dentro dos grânulos α, recentemente sintetizado, é o mesmo multímero que é encontrado na circulação. Uma proteólise limitada ocorre no plasma e o alvo principal são as grandes moléculas dos multímeros pró-trombóticos. Essa clivagem é executada por uma protease chamada de ADAMTS13.

O gene para o FVW está localizado no cromossomo 12, e o número de polimorfismos e mutações foi identificado no sequenciamento do gene. As anormalidades genéticas responsáveis por muitos pacientes com DVW não foram identificadas.

O FVW apresenta sítios de ligação para receptores plaquetários, à glicoproteína Ib (GP-Ib) e ao colágeno do subendotélio. A ligação do FVW a esses receptores resulta em uma adesão das plaquetas ao subendotélio dos vasos lesados

e uma interação de plaquetas-plaquetas, chamada de agregação plaquetária. A ligação do FVW aos receptores GP-Ib não requer ativação prévia das plaquetas. O FVW possui um segundo sítio de ligação para outro receptor plaquetário, a glicoproteína IIb/IIIa (GP-IIb-IIIa), e essa ligação requer uma ativação prévia das plaquetas para a exposição a este receptor. Outros sítios de ligação para a heparina e sulfatídeos estão presentes nos monômeros do FVW.

O FVW contém um sitio de ligação para o fator VIII que protege o fator VIII da proteólise na circulação. A interação não covalente do FVW com o fator VIII prolonga a meia-vida do fator VIII na circulação por cinco vezes. Em adição à interação com as plaquetas descritas anteriormente, a ligação e proteção do fator VIII é outra função importante do FVW. Um defeito na molécula do FVW leva a um distúrbio hemorrágico no qual aparece uma diminuição do fator VIII circulante devido a uma rápida depuração. O FVW é importante para a interação plaqueta-vaso e plaqueta-plaqueta. As plaquetas são normais na DVW.

O FVW pode apresentar um valor de referência muito amplo (50% a 200%) no plasma, pois condições fisiológicas e patológicas podem alterar o nível do FVW na circulação. O estrogênio e os hormônios tireoidianos são importantes na regulação da síntese do FVW, e um nível baixo de hormônio tireoidiano pode levar a uma redução importante do FVW. Os níveis do FVW encontram-se nos limites inferiores da normalidade durante a fase folicular da mulher no seu ciclo menstrual e geralmente estão elevados durante a última fase lútea. Durante o segundo e terceiro trimestre da gravidez, o FVW aumenta de duas a três vezes, frequentemente determinando níveis "normais" de FVW em pacientes com doença de von Willebrand (DVW) leve. Os níveis de FVW podem cair em poucas horas após o parto. Na fase aguda de um processo inflamatório, os níveis de FVW aumentam durante a inflamação. Uma variação importante ocorre nos níveis do FVW em pessoas com diferentes grupos sanguíneos. As pessoas do grupo O tem níveis circulantes de FVW de aproximadamente 30%, mais baixos que os indivíduos dos grupos A, B ou AB. Isso deve ser levado em conta quando se tenta fazer um diagnóstico definitivo de DVW em um paciente que se apresenta com valores laboratoriais do FVW ligeiramente baixos.

QUADRO CLÍNICO

Os pacientes com as formas moderadas ou graves da DVW apresentam sintomas hemorrágicos desde a infância ou na adolescência; no entanto a doença pode manifestar-se em qualquer idade por causa do grande espectro de gravidade dos sintomas hemorrágicos. Homens e mulheres são afetados com a mesma frequência por causa da transmissão autossômica que ocorre na maioria das DVW, e a maior parte dos pacientes tem uma doença leve ou moderada. Desde que uma das funções primárias do FVW é dar um suporte normal à função das plaquetas, as manifestações hemorrágicas nos pacientes com DVW são similares àquelas observadas nos pacientes com distúrbios plaquetários: equimoses, sangramento das mucosas, epistaxe, sangramento da cavidade oral, menorragia, hemorragia pós-parto e hemorragia gastrintestinal.

Os pacientes podem chamar a atenção para um sangramento pós-cirúrgico (frequentemente pós exodontia ou tonsilectomia) ou com o início da menstruação. O sangramento mais sério é, geralmente, a hemorragia gastrintestinal e pode apresentar risco de morte quando associada com angiodisplasia. Os pacientes com a forma rara da DVW, o tipo 3, são gravemente afetados e apresentam níveis muito baixos de fator VIII (1% a 10%) bem como do FVW. Esses pacientes podem ter sangramentos graves, como hemartroses e hematomas semelhantes aos sintomas dos hemofílicos, assim como sintomas secundários à disfunção plaquetária. O primeiro paciente descrito por von Willebrand tinha o tipo 3 da doença.

A intensidade do sangramento pode variar entre membros da mesma família e, em um grau menor, no mesmo indivíduo. Como mencionado anteriormente nesse capítulo, os níveis do FVW e os sintomas hemorrágicos também podem variar nos processos inflamatórios, estimulação adrenérgica, gravidez e durante tratamento ou reposição de estrogênio.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Os testes laboratoriais são fundamentais para o diagnóstico da DVW. Inicia-se pelos exames mais simples e depois seguem-se os mais complexos e muitas vezes trabalhosos (Quadro 60.1). O hemograma, a contagem de plaquetas e o tempo de protrombina são importantes para o diagnóstico diferencial. Os exames que poderão estar alterados na DVW são: PTTA, dosagem do fator VIII coagulante (FVIII:C), antígeno do fator de von Willebrand (FVW:Ag), atividade do cofator da ristocetina (FVW:RCo) e, em alguns casos mais complicados para o diagnóstico, poderão ser necessárias a pesquisa dos multímeros do FVW e a agregação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA).

Quadro 60.1 Exames para o diagnóstico e classificação da DVW.

Exames para o diagnóstico
Fator de von Willebrand (FVW)
Atividade de cofator de ristocetina (FVW:RCo) ou Atividade da ligação do fator de von Willebrand ao colágeno (FVW:CB)
Dosagem do fator VIII coagulante (FVIII:C)
Exames para a classificação
Multímeros do fator de von Willebrand
Agregação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA)

O *Fator de von Willebrand (FVW)* ou o *Antígeno do Fator de von Willebrand (FVW:Ag)* geralmente é avaliado através de

métodos imunológicos (Elisa)[56] e vários métodos automatizados disponíveis na atualidade. O método turbidimétrico, que consiste na aglutinação de partículas de látex revestidas com anticorpo do FVW, quando se adiciona o plasma do paciente.

A atividade é geralmente avaliada usando o exame do *Cofator da Ristocetina (FVW:Co*), que é o padrão ouro, apesar de ser um teste de difícil padronização interlaboratorial. Esse teste é realizado fazendo-se diluições do plasma do paciente e misturando as diluições com plaquetas normais e lavadas para remover qualquer vestígio do FVW e adicionando ristocetina na concentração de 1,0 a 2,0 mg/mL e, finalmente, mede-se o tempo de aglutinação das plaquetas de forma visual ou através de um agregômetro. Atualmente foram desenvolvidos sistemas automatizados que apresentam uma boa correlação com o método do cofator da ristocetina.

Outra forma de avaliar a atividade do FVW é através da *Ligação do Fator de von Willebrand ao Colágeno (FVW:CB)*: também é um teste funcional que quantifica a ligação do FVW ao colágeno que reveste os orifícios das placas. O *Tempo de Sangramento* não é específico e pouco sensível para o diagnóstico da DVW.

A *atividade do FATOR VIII (FVIII:C)* é medida por um método funcional utilizando uma modificação do PTTA, e um resultado normal do fator VIII não exclui a possibilidade de uma DVW.

Os *Multímeros do FVW* são avaliados através de uma eletroforese do plasma em gel de agarose em baixas concentrações com um anticorpo específico para o FVW, para a visualização dos multímeros. A avaliação dos multímeros mede a diminuição ou ausência de multímeros de alto peso molecular do FVW, que ocorre no tipo 2 da DVW (subtipos 2A e 2B). A *Agregação Plaquetária Induzida pela Ristocetina (RIPA)* pode detectar o "ganho da função" do FVW que ocorre em pacientes com o tipo 2B, e essa prova é utilizada com o objetivo de identificar este tipo de DVW. Nesse teste, usam-se as plaquetas e o plasma do paciente (plasma rico em plaquetas – PRP), e várias concentrações baixas de ristocetina são adicionadas em vários tubos contendo PRP do paciente. Baixa concentração de ristocetina (geralmente 0,6 mg/mL) não é capaz de provocar agregação das plaquetas em um plasma normal, mas consegue agregar no paciente com o tipo 2B da DVW.

CLASSIFICAÇÃO

A DVW é classificada em três tipos, conforme os resultados dos exames laboratoriais. O tipo 1 apresenta uma diminuição quantitativa parcial do FVW e compreende 70% a 75% dos casos de DVW; o tipo 2 constitui um grupo de variantes com defeito qualitativo na molécula do FVW, compreende de 20% a 25% dos casos de DVW; e o tipo 3 é uma forma rara homozigota ou dupla heterozigose caracterizada por níveis muito baixos de FVW que ocorre em menos de 1 caso por milhão de pessoas.

DVW TIPO 1

Transmitida por um gene dominante, geralmente está associada com sintomas leves ou moderados de sangramento, embora possa apresentar, ocasionalmente, hemorragia mais grave. Na infância a epistaxe é uma característica e pode desaparecer na puberdade. As mutações foram identificadas em 60% a 70% dos casos.

O FVW:Ag e a atividade (FVW:RCo e a FVW:CB) geralmente estão diminuídos concomitantemente e o fator VIII:C está diminuído. A RIPA está diminuída e os multímeros do FVW estão presentes (normais).

DVW TIPO 2

O tipo 2 é dividido em 4 subtipos e suas frequências variam em diferentes partes do mundo.

Tipo 2A

O subtipo 2A geralmente é transmitido por um gene autossômico dominante e sua prevalência é de 10% a 15% dos casos de DVW. Geralmente os sintomas hemorrágicos são moderados a graves.

O FVW:Ag está diminuído ou normal, o FVW:RCo diminuído desproporcionalmente ao FVW:Ag, e o FVIII:C pode estar normal ou diminuído. A RIPA geralmente está diminuída e os multímeros mostram uma distribuição anormal com ausência de multímeros de pesos moleculares altos e intermediários.

Tipo 2B

Este subtipo é transmitido por um gene autossômico dominante e, geralmente, a doença se manifesta de forma moderada a grave e representa aproximadamente 5% dos pacientes com DVW. As mutações responsáveis por esse tipo de DVW determinam a ligação espontânea das plaquetas na circulação, o que resulta na remoção dos grandes multímeros e, em algumas situações, as plaquetas, provocando uma trombocitopenia. Essa trombocitopenia é devida à formação de pequenos agregados plaquetários formados na circulação e sua subsequente remoção.

O FVW:Ag está reduzido ou normal e o FVW:RCo mostra-se bastante diminuído devido à ausência dos multímeros de alto peso molecular. O FVIII:C está diminuído ou normal. A RIPA está aumentada e os multímeros de alto peso molecular estão diminuídos ou ausentes, embora de uma forma menos intensa do que no subtipo 2A.

Tipo 2M

O subtipo 2M é geralmente transmitido por um gene autossômico dominante e está presente em menos de 5% da população com DVW. Esse tipo é caracterizado por uma diminuição na ligação da molécula anormal do FVW aos receptores GPIb das plaquetas, no entanto os multímeros apresentam uma distribuição normal na eletroforese em gel.

O nível do FVW:Ag está variavelmente diminuído, o FVW:RCo está mais intensamente reduzido que o FVW:Ag. O FVIII:C está reduzido e a RIPA diminuída.

Tipo 2N

Geralmente, esse tipo mostra um padrão de transmissão autossômica recessiva. Os pacientes com esse subtipo apresentam níveis baixos de FVIII:C e a doença pode ser confundida clinicamente, mas não geneticamente, com hemofilia A. Os sintomas hemorrágicos são de moderados a moderadamente graves. Essa mutação provoca uma diminuição da ligação do FVIII:C ao FVW, o que determina uma redução na proteção do FVIII:C na circulação. A meia vida do FVIII:C reduz de 8 a 12 horas para apenas 2 horas. O nível do FVIII:C é baixo (geralmente de 5% a 15%) enquanto o FVW:Ag, o FVW:RCo, a RIPA e os multímeros do FVW são normais.

Pelo fato de o tipo 2N da DVW apresentar uma deficiência do FVIII:C, esse subtipo pode ser confundido com o diagnóstico de hemofilia A. A presença de uma transmissão autossômica e a história de sangramento em mulheres faz com que esses pacientes sejam testados para o tipo 2N da DVW.

DVW TIPO 3

Esse tipo é caracterizado por uma deficiência grave do FVW e uma moderada a grave deficiência do FVIII:C. Esse subtipo é raro e é transmitido de forma homozigota ou por dupla heterozigose. Os pacientes podem apresentar sintomas hemorrágicos tanto em decorrência da deficiência do FVW (sangramentos de mucosas) como em consequência da deficiência grave do FVIII:C (sangramentos das articulações). Os testes laboratoriais mostram que o FVW:Ag está extremamente reduzido ou imensurável, FVW:RCo muito reduzido, RIPA ausente e os multímeros do FVW estão, geralmente, indetectáveis. O FVIII:C está entre 2% e 10%.

■ DOENÇA DE VON WILLEBRAND ADQUIRIDA

A DVW adquirida pode surgir espontaneamente ou pode estar associada com doenças que determinam a redução do FVW por vários mecanismos: anticorpos contra o FVW, aumento da proteólise do FVW, ligação do FVW com células (geralmente células tumorais) ou diminuição da síntese do FVW. Os anticorpos ocorrem mais frequentemente nas doenças autoimunes ou doenças linfoproliferativas. O aumento da proteólise ocorre em pacientes com fibrinólise aumentada e nas situações de aumento do cisalhamento vascular, tais como nas doenças cardíacas congênitas e nas estenoses da válvula aórtica. Adsorção pelo tumor foi descrita no tumor de Wilms. A diminuição de síntese foi descrita no hipotireiodismo. Trombocitoses acentuadas têm sido relacionadas com DVW adquirida devido à ligação do FVW pelas plaquetas anormais aumentadas. Alguns medicamentos, como o ácido valproico e o dextran, podem estar associados à DVW adquirida. O diagnóstico da DVW adquirida repousa sobre a história recente de sangramentos cutaneomucosos, a ausência de história de sangramentos anteriores, história familiar negativa e a diminuição do FVW:Ag e do FVW:RCo. A eletroforese em gel, geralmente, mostra uma redução dos multímeros de alto peso molecular.

■ TRATAMENTO

O tratamento adequado depende do tipo de DVW que o paciente apresenta e, por meio dos exames laboratoriais, a avaliação deve ser completa antes de a terapia começar, se o tempo permitir. Tem de ser avaliado o estado geral do paciente, as doenças associadas, as medicações de uso (principalmente medicamentos contendo aspirina, anti-inflamatórios não esteroides e outras drogas antiplaquetárias) devem ser consideradas. Esses fatores podem influenciar na decisão acerca da duração do tratamento e se será necessário administrar medicação adicional ou reposição de concentrado de plaquetas em casos de sangramentos mais importantes. Os pacientes com DVW que apresentam doenças cardíacas com indicação de antiagregantes plaquetários devem ser tratados com cuidado, e esses pacientes devem ser informados do risco de sangramento e observados de perto quando em uso dessas drogas. Como nenhum teste de laboratório consegue prever ou correlacionar bem com a gravidade do sangramento, o paciente deve ser monitorizado clinicamente. Entretanto, uma conduta geral e empírica é usar uma terapia para aumentar a atividade do FVW e o FVII:C para 50% a 100%. Na prática, isto é feito somente com o nível do FVIII:C, que pode (quando pode) ser avaliado em um tempo adequado para uma tomada de decisão. O tratamento pode ser feito com a desmopressina, reposição do concentrado de FVW, antifibrinolíticos, agentes tópicos e estrogênio (em mulheres selecionadas) (Quadro 60.2).

■ DESMOPRESSINA (DDAVP)

A desmopressina (1-desamino-8-D-arginina vasopressina ou DDAVP) é um análogo sintético do hormônio antidiurético que provoca liberação do FVW e do FVIII:C dos corpúsculos de estoque por uma ação indireta O DDAVP é o tratamento de escolha na maioria dos pacientes com o tipo 1 da DVW.

Embora a maioria dos pacientes com o tipo 1 da DVW responda ao DDAVP, é recomendado que todo paciente que receberá DDAVP para tratamento pela primeira vez faça um teste terapêutico antes. O DDAVP pode ser administrado tanto via endovenosa (EV), na dose de 0,3 μg/kg (dose limite máxima de 20 μ/g), como por via intranasal, na dose de 300 μg para pacientes acima de 50 kg ou 150 μg para pacientes com menos de 50 kg. Na aplicação endovenosa, o DDAVP é diluído em 50 mL de soro fisiológico e administrado durante 20 a 30 minutos. Um aumento nos níveis do FVW e do FVIII:C de duas a cinco vezes é esperado dentro de 30 a 90 minutos após a administração, e os valores retornam aos níveis de base aproximadamente 8 a 10 horas após.[14] Podem ocorrer efeitos colaterais, como rubor, hipertensão, hipotensão, cefaleia, desconforto abdominal e raramente parestesia. Existem dúvidas se o DDAVP pode causar trombose, por-

Quadro 60.2 Tratamento da doença de von Willebrand.

Medicação	Dose e comentários
Desmopressina (DDAVP)	EV: 0,3 μg/kg em 50 mL de soro fisiológico durante 20 minutos *Spray* nasal: > 50 kg: 300 μg (1 *spray* em cada narina) < 50 kg: 150 μg (1 *spray* em apenas uma narina) Benéfico na maioria dos pacientes com o tipo 1. Benefício variável no tipo 2 (a trombocitopenia pode piorar em alguns pacientes com o tipo 2B). O paciente deve fazer teste terapêutico antes de um procedimento invasivo. Pode repetir a dose de 12 em 12h ou de 24 em 24h (A dose total não deve exceder a 3–4 doses, devido à taquifilaxia e à possível hiponatremia.
Concentrado de FVW de pureza intermediária	Dose inicial: 30–60 UI/kg. Depois de 20–40 UI/kg de 12/12h para manter níveis de FVW entre 30%–50% a 100% ou controle clínico do sangramento. Os níveis devem ser mantidos durante 7–14 dias para cirurgias maiores e 1–5 dias para cirurgias menores. A dose e a duração são baseadas na experiência clínica. Alguns procedimentos podem requerer somente uma dose profilática.
Antifibrinolíticos	Ácido ε-aminocaproico: 50 mg/kg (máximo de 5 doses) 4 x dia
	Ácido tranexâmico: 25 mg/kg 3 × dia

tanto deve ser usado com cuidado em pacientes com coronariopatia. A taquifilaxia ocorre após doses repetidas, e a hiponatremia importante com convulsões foi observada em alguns pacientes.[16] O DDAVP é administrado de 1 a 2 horas antes do procedimento e pode ser repetido diariamente por 2 a 3 dias após o procedimento, quando necessário.

TERAPIA DE REPOSIÇÃO COM O FVW

Várias preparações que contêm o FVW são disponíveis para o tratamento da doença de von Willebrand e são chamadas de *FVW de pureza intermediária e de alta pureza*. O concentrado de fator VIII purificado por anticorpo monoclonal e o recombinante não são recomendados porque, nas suas preparações, eliminam o FVW. A maioria dos especialistas não recomenda o uso do crioprecipitado, pelo risco de transmissão de vírus. Os concentrados são administrados em 15 minutos por infusão endovenosa, mas estudos mostram que a dose total pode ser reduzida em 20% a 50% quando usada dose contínua. A repetição pode ser necessária a cada 12 horas durante 7 a 10 dias para cirurgias maiores ou episódios importantes de sangramento.

A terapia de reposição é usada no tipo 3 e nos pacientes com o tipo 2 que não respondem ao DDAVP e naqueles do tipo 1 que também não respondem ao DDAVP ou que precisam de um tratamento a longo prazo, o que não pode ser feito com o DDAVP por causa do risco de taquifilaxia após 2 ou 3 dias de uso.

ANTIFIBRINOLÍTICOS

Tanto o ácido ε-aminocaproico como o ácido tranexâmico são usados para o tratamento da DVW, principalmente nos sangramentos oral e de outras mucosas. Quando usado por via oral, deve ser administrado de 3 a 4 vezes por dia. As dosagens devem ser ajustadas nos pacientes com insuficiência renal crônica. Essas drogas podem ser dadas, também, por via intravenosa e devemos lembrar do risco de trombose nos pacientes suscetíveis.

AGENTES TÓPICOS

Geralmente, os agentes tópicos são administrados por via oral ou nasal e fornecem um tratamento na superfície do sangramento. Agentes hemostáticos absorvíveis, como Gelfoam ou Surgicel, são embebidos em trombina tópica antes da aplicação no local do sangramento. Um colágeno micronizado (Avitene) e uma cola de fibrina também são usados topicamente.

ESTROGÊNIO

O estrogênio pode aumentar a síntese do FVW, e mulheres com DVW leve a moderada podem se beneficiar com o tratamento com estrogênio. Em algumas mulheres, a dosagem do hormônio corresponde à dose usada na reposição hormonal.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Alperin JB. Estrogens and surgery in women with von Willebrand´s disease. Am J Med. 1982;73:367-71.
2. Aylesworth CA, Smallridge RC, Rick ME, et al. Acquired von Willebrand´s disease: a rare manifestation of pospartum thyroiditis. Am J Hematol. 1995;50:217-9.
3. Chang AC, Rick ME, Pierce LR, et al. Summary of a workshop on potency and dosage of von Willebrand factor concentrates. Haemophylia. 1998;4(suppl 3):1-6.
4. D`Amico EA, Villaça PR, Valin AKZ. Doença de von Willebrand. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Tratado de Hematologia. São Paulo: Atheneu, 2013. p.637-45.
5. Dalton RG, Savidge GF, Matthews KB, et al. Hipothyreodism as a cause of acquired von Willebrand´s disease. Lancet. 1987;1:1007-9.
6. Eikenboon JCJ, van der Meer FJM, Briet E. Acquired von Willebrand´s disease due to excessive fibrinolysis. Br J Haematol. 1992;81:618-20.
7. Favaloro EJ, Smith J, Petinos P, et al. Laboratory testing for Von Willebrand`s disease an assessment of current diagnostic practice and efficacy by means of a multi-laboratory survey. RCPA Quality Assurance Program (QAP) in Haematology Haemostasis Scientific Advisory Panel. Thromb Haemost. 1999;82:1276-82.
8. Goodeve A, Eikenbom J, Castaman G, et al. Phenotype and Genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease. Blood. 2007;109:112-21.
9. Handin RI, Martin V, Moloney WC. Antibody-induced von Willebrand´s disease: a newly defined inibitor syndrome. Blood. 1976;48:393-405.
10. James PD, Goodeve AC. von Willebrand disease. Genet Med. 2011;13:365-76.
11. Jonge Poerink-Stockschlader AB, Dekker I, Risseeuw-Appel IM, et al. Acquired von Willebrand disease in children with a Wilms tumor. Med Pediatr Oncol. 1996;26:238-43.
12. Kreuz W, Linde R, Funk M, et al. Valproate therapy induces von Willebrand disease type I. Epilepsia. 1992;33:178-14.
13. Mannucci PM, Bettega D, Cattaneo M. Paterns of development of tachyphylaxis in patients with haemophylia and von Willebrand disease after repeated doses of desmopressin (DDAVP). Br J Haematol. 1992;82:87-93.
14. Mannucci PM, Lusher JM. Desmopressin and thrombosis (letter). Lancet. 1989.2:675-76.
15. Mannucci PM. Treatment of von Willebrand´s Disease. N Engl J Med. 2004;351:683-94.
16. Mohri H, Motomura S, Kanamori H, et al. Clinical significance of inhibitors in acquired von Willebrand syndrome. Blood. 1998;91:3623-9.
17. Sanfelippo MJ, Suberviola PD, Geimer NF. Development of a von Willebrand-lyke syndrome after prolonged use of hydroxyetil starch. Am J Clin Pathol. 1987;88:653-5.
18. Scott JP, Montgomery RR. Therapy of von Willebrand disease. Semin Thromb Hemost. 1993;19:37-47.
19. Tied A, Rand JH, Budde U, et al. How I treat acquired von Willebrand syndrome. Blood. 2011;117:6777-85.

61

capítulo

Fernando Pretti

Coagulação Intravascular Disseminada

FISIOPATOLOGIA

A coagulação inicia-se pela interrupção da camada endotelial do sistema vascular ou através da entrada de fator tecidual (FT) na circulação. O sistema intrínseco da coagulação pode ser ativado pela interação do sangue com o subendotélio e o colágeno. O FT no interior da maioria das células é liberado com o rompimento celular, causando a ativação do sistema extrínseco da coagulação. O estímulo é prolongado o suficiente para gerar a formação de trombina e, durante a cascata de ativação, cada etapa deve passar por barreiras fisiológicas, como uma potencial inativação dos fatores da coagulação (fatores XIa, Xa, IXa, VIIa e IIa) pela antitrombina III (ATIII) ou degradação dos cofatores ativados (fatores Va e VIIIa) pelo sistema da proteína C (PC). A trombina gerada continua a evitar a ATIII, assim como a trombomodulina (TM), para, finalmente, converter o fibrinogênio em fibrina. Tudo isso é completamente fisiológico após uma incisão cirúrgica ou outro evento para o qual a hemostasia é solicitada e desejável. Quando uma lesão do endotélio vascular estiver sendo corrigida, um apropriado sistema pró-coagulante, principalmente a trombina, permanece ativo para neutralizar os inibidores fisiológicos da coagulação. O coágulo formado gera sua própria dissolução, pela incorporação do plasminogênio, que por sua vez é ativado pelo sistema fibrinolítico. O coágulo permanece no local até ser eliminado pela ação da plasmina. Qualquer excesso da plasmina é neutralizado por seu inibidor, α_2-inibidor da plasmina (α_2-PI). Fisiologicamente, isso tudo acontece continuamente.

O que separa o processo fisiopatológico de coagulação intravascular disseminada (CID) da coagulação fisiológica é a combinação do começo da excessiva coagulação, não fisiológica, contínua (problemas obstétricos, sepse, câncer, trauma) e uma eventual incapacidade para neutralizar produtos da coagulação ativados na circulação em decorrência da exaustão do sistema inibidor (deficiências congênitas, insuficiência hepática ou circulação comprometida), de tal modo que os estímulos que iniciam a coagulação não são neutralizados. O estímulo sendo maciço, contínuo e/ou não neutralizado, o resultado é uma onda de pró-coagulantes que inundam os inibidores fisiológicos, resultando na formação de trombina e plasmina, que estarão livres como dois agentes-chave responsáveis pela CID. As manifestações clínicas da CID podem ser explicadas pela circulação patológica da trombina e da plasmina. A trombina provocará uma coagulação intravascular do fibrinogênio, especialmente na microcirculação, e a deposição de plaquetas em áreas não fisiológicas. A plasmina degrada o fibrinogênio, a fibrina e vários fatores da coagulação, gerando produtos de degradação do fibrinogênio e da fibrina (PDF) e D-dímeros, característicos da CID. Na CID mais intensa, os níveis do inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1), paradoxalmente, aumentam, em virtude de ser proteína de fase aguda, muito intensificada pelas citocinas. O aumento do PAI-1 inibe o sistema fibrinolítico, provocando mais trombose. O D-dímero é um PDF específico gerado pela lise provocada pela plasmina sobre a fibrina que foi polimerizada pelo fator XIIIa (Figura 61.1).

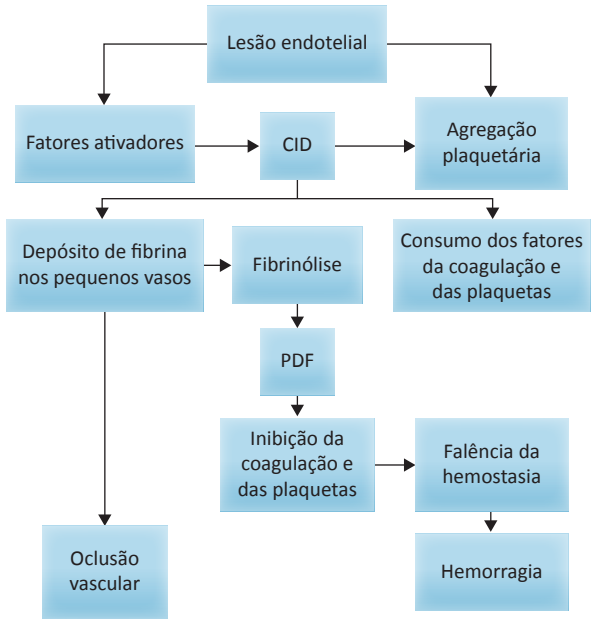


Figura 61.1 Patogênese da CID.
Fonte: A Victor Hoffbrand; Jhon E Pettit., 2000.

CAUSAS DA CID

A CID não é considerada uma doença específica, mas sim uma manifestação de um processo patológico, assim como é a febre, a hiponatremia ou a dor abdominal. Essas são anormalidades que não são consideradas como doenças e ocorrem sempre devido a uma causa básica. Portanto, reconhecer a CID em um paciente implica que uma doença de base é a causa desse processo. A CID deve ser considerada como um indicador de uma grave doença ou injúria que é bastante óbvia (p. ex.: queimaduras, falência cardiovascular, carcinomatose, sepse) e ainda, ocasionalmente, a CID serve como parte do diagnóstico original, que pode ajudar a estabelecer a doença de base. Exemplo disso é o reconhecimento da CID que ocorre na distinção da febre da meningococcemia da febre causada por vírus em um paciente jovem; da leucemia promielocítica de outros tipos de leucemias; e a diferenciação do descolamento abrupto da placenta de outras complicações obstétricas menos graves (Tabela 61.1).

Tabela 61.1 Processos que podem induzir a CID.

Lesões teciduais	Neoplasias
• Trauma • Esmagamento • Injúria do sistema nervoso central • Insolação • Queimaduras • Reação hemolítica transfusional • Rejeição aguda a transplante	• Câncer • Leucemias • Quimioterapia de câncer • Síndrome da lise tumoral
Infecções	**Complicações obstétricas**
• Bactéria Gram-positiva • Bactéria Gram-negativa • Esporotricose • Rickettsiose • Protozoários • Fungos • Viroses	• Descolamento da placenta • Placenta prévia e acreta • Feto morto retido • Embolia de líquido amniótico • Atonia uterina • Aborto provocado • Toxemia da gravidez
Outras causas	**Outras causas**
• Choque • Parada cardíaca • Aneurisma de aorta • Mordida de cobra	• Afogamento • Embolia gordurosa • Hemangiomas gigantes

Fonte: Craig S. Kitchens; *et al.*, 2013.

INÍCIO DA CID

O início da ativação da coagulação, pelas lesões teciduais, injúria endotelial e a exposição do sangue pelos produtos das bactérias, células necróticas e tecido subendotelial está corretamente representado tanto pelo mecanismo intrínseco como pelo extrínseco. Entretanto, o mecanismo intrínseco parece que atualmente é menos importante que o FT direcionado para o sistema extrínseco como iniciador da CID. As endotoxinas podem ativar o sistema intrínseco. Estes sistemas convergem para a geração de trombina, que é essencial para a hemostasia normal ou alterada. A trombina ativa as plaquetas, coagula o fibrinogênio e ativa os fatores V, VIII e XIII. Quando seus inibidores ficam sobrecarregados, a geração de trombina torna-se patológica e começa a CID.

A trombina circulante liga-se à trombomodulina (TM), presente no endotélio vascular. Quando a trombina se liga à TM forma, um complexo Trombina/TM, que se transforma de um pró-coagulante potente em um potente anticoagulante, em virtude da ativação do sistema proteína C e proteína S, que por sua vez ativa o sistema fibrinolítico por neutralizar o PAI-1. O resultado é a transformação do plasminogênio em plasmina, que causa não somente a degradação da fibrina e do fibrinogênio, mas também dos fatores V, VIII e XIII. A degradação do fibrinogênio e da fibrina resulta nos PDF e D-dímeros. Os níveis de PAI-1 aumentam bastante em processos inflamatórios e o sistema fibrinolítico para, potencializando tromboses catastróficas. O quadro clínico da CID pode variar bastante conforme o agente causador. Por exemplo, a meningococcemia apresenta um quadro clínico agudo, enquanto no feto morto retido geralmente é um processo crônico. O aneurisma da aorta pode produzir uma CID crônica ao passo que a leucemia promielocítica provoca uma CID aguda. Em outras situações, o processo pode ser mais hemorrágico (descolamento prematuro da placenta) ou pode predominar o quadro trombótico (síndrome de Trosseau).

DIAGNÓSTICO DA CID

As manifestações clínicas mais comuns da CID são a hemorragia, a trombose, frequentemente resultando na disfunção dos órgãos. O sangramento ocorre de todas as incisões, das mucosas levemente traumatizadas, locais de punções venosas e hematúria. Às vezes, a trombose é a primeira alteração clínica que pode ocorrer sob a forma de equimose, a qual pode evoluir rapidamente para uma púrpura fulminans, ausência de pulso com extremidades frias, ou uma perda súbita da visão ou alterações neurológicas secundárias à trombose.

O diagnóstico da CID é, sobretudo, um diagnóstico clínico, porque os pacientes já apresentam uma forte suspeita clínica para desenvolver uma CID, e somente poucos exames simples serão necessários para confirmar o diagnóstico. Os exames sugeridos são: Tempo de protrombina (TP), Tempo de tromboplastina parcial ativada (PTTA), Tempo de trombina (TT), Contagem de plaquetas, PDF ou D-dímero, Fibrinogênio e o exame do esfregaço sanguíneo. Na CID mais grave, o PT e o PTTA estão prolongados de 50% a

70% dos casos, em decorrência do consumo de vários fatores da coagulação. O TT está prolongado em 70% a 80% dos casos, provocado pela queda do fibrinogênio e pela presença do PDF ou D-dímero. As plaquetas estão moderadamente reduzidas ou pelo menos em número menor do que antes do início da CID em 80% a 90% das vezes. A contagem inicial, caracteristicamente, não é menor do que 30.000 a 40.000/mm^3. O PDF ou o D-dímero estão presentes em 95% dos casos, e em 100% quando a CID está bem estabelecida. A hematoscopia confirma a trombocitopenia e mostra a presença de hemácias fragmentadas (esquizócitos) na metade dos casos.

Outros exames mais sofisticados podem mostrar-se alterados na CID, mas, considerando a demora na liberação desses ensaios, e considerando que a CID é uma situação muito dinâmica, essas outras provas não são práticas para o diagnóstico. Essas provas requerem muito mais tempo, muita experiência do laboratório, além de terem custo elevado, e não acreditamos que acrescentariam mais informações do que os testes mais simples descritos anteriormente (Tabela 61.2).

Tabela 61.2 Exames sugeridos para o diagnóstico de CID.

Tempo de protrombina (TP)
Tempo de tromboplastina parcial ativada (PTTA)
Tempo de trombina (TT)
Fibrinogênio
Contagem de plaquetas
PDF ou D-dímero
Hematoscopia

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Pelo fato de outras patologias poderem apresentar quadros clínico e laboratorial que possam simular uma CID, várias situações devem ser consideradas como diagnóstico diferencial. Nos pacientes com cirrose hepática, caem os níveis de vários fatores da coagulação, incluindo o fibrinogênio, a antitrombina-III (AT-III), a proteína C, a proteína S e o plasminogênio, em decorrência da falta de produção. O fígado depura a pequena quantidade de PDF formado pela produção fisiológica, e a diminuição na depuração do PDF leva a um acúmulo no sangue. A hipertensão portal com hiperesplenismo é, também, uma característica da cirrose avançada e, por isso, a trombocitopenia está frequentemente presente. A hemorragia que ocorre nesses pacientes não é pela CID, mas sim pela hipertensão portal e pela falência hepática.

A coagulopatia dilucional pode causar confusão com o diagnóstico de CID ou pode estar associada a ela, mas não causa CID no sentido de uma produção exagerada de trombina.

Realmente, a distinção entre CID, a síndrome HELLP, o fígado gorduroso agudo da gravidez, a pré-eclâmpsia, a eclâmpsia, a trombose maciça, a púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), pode apresentar um desafio. O tratamento das pacientes com síndrome HELLP é a retirada da criança e da placenta o quanto antes. Sendo possível, espera-se uns dias extras para aumentar a viabilidade do feto, desde que essa síndrome se torne mais branda no início do terceiro trimestre. Paradoxalmente, a paciente com síndrome HELLP frequentemente piora 2 a 4 dias antes ou após o parto. Deve-se ficar atento, nessa época, para a possibilidade de ocorrer uma trombose, e isto pode justificar a administração profilática de heparina imediatamente após o parto se a contagem de plaquetas for menor que 20.000/mm^3. Distinguir a síndrome HELLP da CID pode ser difícil ou impossível.

Embora a PTT seja um processo claramente trombótico, com danos maiores para os órgãos, como consequência da deposição patológica intravascular de grandes agregados plaquetários, não pode ser considerada uma CID. O PT, o PTTA, o TT e o PDF estão sempre próximos dos níveis normais na PTT. A hemólise microangiopática é uma marca da PTT.

A crotalase, um veneno de cobra com uma ação semelhante à trombina, coagula parcialmente o fibrinogênio, mas não ativa as plaquetas e nem se liga a AT-III, o que diferencia sua ação da trombina. Embora esse veneno na circulação lembre a CID, geralmente não ocorre trombose e nem hemorragia.

Já é de conhecimento de longa data a associação entre tromboembolismo e o câncer. Se o tromboembolismo ocorre, como descrito por Trousseau há mais de 100 anos, o processo é conhecido como síndrome de Trousseau. A síndrome de Trousseau é uma associação de hipercoagulabilidade com adenocarcinoma, é reconhecida por características específicas e é considerada uma CID crônica. A síndrome está associada, principalmente, com adenocarcinoma e frequentemente o tumor está oculto. Acredita-se que seja devido à liberação de produtos pró-coagulantes do tumor, sendo um deles o fator tecidual (FT).

Na síndrome de Trousseau pode ocorrer uma CID crônica compensada, e a contagem de plaquetas, o TP, o PTTA e o fibrinogênio podem apresentar resultados diminuídos, normais ou aumentados. Tipicamente, o PDF ou o D-dímero estão aumentados na síndrome de Trousseau. Os vasos envolvidos podem ser as veias, principalmente aquelas de locais atípicos, tais como as veias superficiais do tórax e abdome, subclávias e cerebrais. A trombose arterial pode ocorrer e pode ser súbita, catastrófica ou fatal.

O sistema fibrinolítico pode ser ativado independente do sistema da coagulação. A ativação do sistema fibrinolítico, na grande maioria dos casos de CID, é secundária e fisiológica decorrente da trombose. Em algumas circunstâncias, a fibrinólise pode ativar-se de uma forma primária. A existência da hiperfibrinólise primária, provavelmente, existe em situações especiais. Na fibrinólise primária, a he-

morragia pode ser significativa, mas a trombose não ocorre. A hiperfibrinólise pode ocorrer na presença de alguns casos de carcinomas, nos quais as células podem produzir ativadores do plasminogênio. Na fase final da circulação extracorpórea e no transplante de fígado pode ocorrer uma liberação ativa do ativador do plasminogênio tecidual (APt), resultando, provavelmente, na mais comum causa de sangramento após esses procedimentos. Corroborando com essa hipótese, o uso de antifibrinolíticos está associado com uma diminuição da hemorragia durante tais procedimentos. As provas de coagulação mostram um fibrinogênio muito baixo, altos níveis de PDF e TP, PTTA e TT prolongados. As plaquetas são normais ou próximas do normal.

TRATAMENTO DA CID

Como a CID é uma consequência grave de uma importante doença de base, é razoável entender que o tratamento primário deve ser dirigido para o controle dessa doença. No descolamento prematuro da placenta, o esvaziamento uterino é fundamental para interromper o sangramento. As medidas gerais de suporte (pressão arterial, reposição de líquidos, controle hidroeletrolítico) são importantes para o sucesso do tratamento. A transfusão de plasma fresco congelado e de plaquetyas estão indicadas, quando o paciente apresenta sangramento importante e se as plaquetas estiverem abaixo de 30.000/mm^3. Da mesma forma, na depleção do fibrinogênio e de outros fatores da coagulação, a reposição deve ser pensada quando os níveis estiverem abaixo de 50 mg/dL e menos de 25%, respectivamente. Por outro lado, se o paciente com CID não apresentar sangramento, o PFC, as plaquetas e o fibrinogênio não estão indicados.

A transfusão de AT-III e da proteína C também podem estar indicadas em alguns casos especiais.

O tratamento com heparina permanece bastante controverso. Em alguns estudos, a infusão de heparina pode aumentar a hemorragia e também levar à morte do paciente. Em algumas situações, como síndrome de Trousseau, aneurisma da aorta abdominal e na púrpura fulminas, a heparina tem mostrado bons resultados.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. A Victor Hoffbrand e Jhon E Pettit. Atlas Colorido de Hematologia Clínica , 3a Ed. 2000; 288
2. Boylan JF, Klinck JR, Sandler NA, et al. Tranexamic acid reduces blood loss, transfusion requirements, and coagulation factor use in primary orthopic liver transplantation. Anesthesiology. 1996;85:1043-8.
3. Craig S. Kitchens, Craig M. Kessler e Barbara A. Konkle. Consultative Hemostasis and Thrombosis 2013; 176
4. Gando S, Kamev T, Nanzaki S, et al. Disseminated intravascolar coagulation is a frequente complication of systemic inflammatory response syndrome. Thromb Haemost. 1996;75:224-8.
5. Hickey WF, Garnick MB, Henderson IC, et al. Primary cerebral venous thrombosis in patients with câncer: a rarely diagnosed paraneoplastic syndrome. Am J Med. 1982;73:740-50.
6. Kallis P, Tooze JÁ Talbot S, et al. Aprotinin inhibits fibrinolysis, improves platelets adhesion and reduces bloog loss. Eur J Cadiothorac Surg. 1994;8:315-23.
7. Levi M, ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. N Engl J Med. 1999;341:586-92.
8. Lourenço DM. Coagulação Intravascular Disseminada. In: Figueiredo MS, Kerbauy J, Lourenço DM. Hematologia – Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar da UNIFESP- EPM. São Paulo: Editora Manole, 2011. p.317-21.
9. Mant MJ, King EG. Severe acute DIC. Am J Med. 1979;67:557-63.
10. Meijer K, Smid WM, Geerards S, et al. Hyperfibrinogenolysis in disseminated adenocarcinoma. Blood Coagul Fibrinolysis. 1998;9:279-83.
11. Menell JS Cesarman GM, Jacovina AT, et al. Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia. N Engl J Med. 1999;340:994-1004.
12. Okajima K, Sakamotov Y, Uchiba M. Heterogeneity in the incidence and clinical manifestations of disseminated intravascular coagulation. Am L Haematol. 2000;65:215-22.
13. Ozelo MC, de Paula EV. Coagulação Intravascular Disseminada. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Tratado de Hematologia. São Paulo: Atheneu, 2013. p.647-55.
14. Ridgon EE. Trosseau`s syndrome and acute arterial thrombosis. Cardiovas Surg. 2004;8:214-8.
15. Sack GH, Levin J, Bell WE. Trosseau`s syndrome and other manifestations of chronic disseminated coagulopathy in patients with neoplasm: clinical, pathologic and therapeutic features. Medicine. 1977;56:1-37.
16. Tasi SH Juan CH, Daí MS, et al. Trousseau`s syndrme related to adenocarcinoma of the colon and cholangiocarcinoma. Eur J Neurol. 2004;11:493-6.

62

capítulo

Fernando Pretti

Trombofilia

Aproximadamente uma em cada 1.000 pessoas desenvolve trombose venosa profunda (TVP), a cada ano, nos membros inferiores. Entre 1% e 2% desses pacientes morrem de embolismo pulmonar, e muitos, mais ou menos 25%, sofrem os efeitos da síndrome pós-trombótica crônica. Portanto, isso é importante para identificar os pacientes com predisposição genética para trombose, principalmente aqueles que apresentam TVP recorrente. Os termos hipercoagulabilidade e trombofilia referem-se a situações nas quais os fatores de risco genéticos ou adquiridos, para eventos trombóticos, estão associados com um alto risco de trombose (principalmente trombose venosa). A trombofilia é, principalmente, transmitida por um gene autossômico dominante com perda de função das mutações que afetam os inibidores da coagulação ou ganho de função das mutações que afetam os fatores da coagulação. Curiosamente, pessoas que apresentam níveis, pela metade do normal, dos fatores da coagulação não apresentam tendência hemorrágica, enquanto inibidores da coagulação com níveis pela metade do normal estão associados com um aumento do risco de trombose.

Em 1965, Egeberg, publicou o primeiro caso de deficiência hereditária de antitrombina III (AT-III), e depois isso foi seguido por publicações similares de deficiência de proteína C (PC) e de proteína S (PS). A trombofilia hereditária foi inicialmente considerada uma doença rara e monogênica, mas essa visão foi mudada em meados de 1980. Com a descoberta da resistência à proteína C ativada (RPCA), uma mutação frequente do fator V, conhecida como fator V de Leiden (FV_{Leiden}), mudou-se o paradigma dos fatores de risco para trombofilia genética e mostrou-se o caminho para os estudos da interação entre a genética e as causas adquiridas. Os principais fatores de risco para tromboembolismo venoso (TEV) podem ser divididos entre fatores adquiridos, fatores genéticos e outros fatores que podem variar em função de variações genéticas ainda não identificadas (Tabelas 62.1 e 62.2).

Tabela 62.1 Principais fatores de risco para trombose.

Fatores de risco adquiridos	Fatores de risco genéticos	Outros fatores de risco
Idade	Deficiência de antitrombina III	Hiper-homocisteinemia
História de trombose venosa	Deficiência de proteína C	Fator VIII elevado
Cirurgia	Deficiência de proteína S	Fator XI elevado
Tratamento hormonal	Fator V de Leiden	Fator IX elevado
Síndrome antifosfolípide	Mutação da protrombina	Fator VII elevado
Síndromes mieloproliferativas	Disfibrinogenemia	TAFI elevado
Trauma		TFPI diminuído
Pacientes engessados		RPCA
Obesidade		

TAFI: inibidor da fibrinólise ativável pela trombina; TFPI: inibidor da via do fator tecidual.

Fonte: Victor Marder; *et al.*, 2013.

Tabela 62.2 Risco e prevalência de tromboembolismo venoso.

Defeitos genéticos	Risco de TEV	Prevalência na população normal	Prevalência na população selecionada
AT-III	× 10	0,02%	4,3%
PC	× 4–5	0,2%–0,4%	4,8%
PS	× 4–5	0,16%–0,21%	4,3%
FVLeiden	× 4–5	4,8%	20%–40%
IImutação	× 3–4	2,7%	18%

AT-III: Deficiência de antitrombina III; PC: Deficiência de proteína C; PS: Deficiência de proteína S; FV_{Leiden}: Mutação do fator V de Leiden; $II_{mutação}$: Mutação da protrombina.

Fonte: Victor Marder; *et al*., 2013.

DEFICIÊNCIA DE ANTITROMBINA III

A antitrombina III (AT-III) é uma glicoproteína plasmática com peso molecular de 58.000 daltons, produzida no fígado que inativa a trombina e algumas enzimas responsáveis pela geração de trombina, principalmente o fator X ativado (Xa), e com menor intensidade os fatores IXa, XIa, XIIa, calicreína-cininogenio de alto peso molecular e o fator VIIa do mecanismo extrínseco da coagulação. Esta combinação de ação explica porque a AT-III é um importante anticoagulante natural e esclarece porque pacientes mesmo com deficiência discreta desse inibidor apresentam fenômenos trombóticos importantes. Por causa de seu papel essencial no mecanismo de anticoagulação, a ausência completa de AT-III é incompatível com a vida e as pessoas com deficiência parcial de AT-III apresentam um risco muito alto de desenvolver trombose venosa. Quando a heparina exógena ou o heparan sulfato endógeno, liberado pelo endotélio vascular, liga-se à AT-III, a capacidade inibitória aumenta muitas vezes (Figura 62.1).

Em 1918 foi relatado que a ação anticoagulante da heparina dependia da presença de um cofator plasmático, chamado de AT-III. Egberg em 1965 descreveu uma família de noruegueses, cujos membros apresentavam tendência à trombose venosa associada à deficiência de AT-III. Nessa época foi criado um grande otimismo no que diz respeito ao diagnóstico das doenças trombóticas venosas. Embora a deficiência de AT-III seja muito trombogênica, a decepção foi muito grande, pois apenas 4% a 5% dos pacientes selecionados apresentam a deficiência de AT-III como causa genética de trombose venosa. A partir da década de 1980 e principalmente nos anos 1990 houve um grande salto na descoberta das causas genéticas de tromboembolismo venoso. Mais de 180 mutações diferentes já foram descritas, determinando defeitos quantitativos e funcionais da AT-III.

A deficiência de antitrombina III é transmitida por um gene autossômico dominante e são descritos dois tipos de defeitos. No tipo I há redução na síntese da molécula de AT-III, e no tipo II existe um defeito funcional. Portanto, quando da avaliação de uma possível deficiência de AT-III, devemos

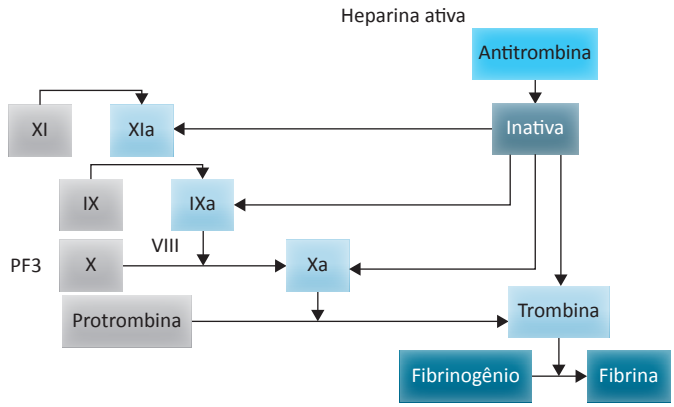


Figura 62.1 Ação da antitrombina + heparina sobre os fatores da coagulação.

Fonte: A Victor Hoffbrand; Jhon E Pettit., 2000.

optar pela metodologia funcional, pois detecta alteração nos dois tipos. Os pacientes geralmente apresentam tromboembolismo venoso (TEV) recorrente, frequentemente do final da 2ª década até a 3ª década da vida, embora alguns indivíduos chegam à velhice sem desenvolver episódios trombóticos, enquanto algumas crianças podem apresentar trombose precocemente. Mais de 50% dos pacientes com deficiência de AT-III desenvolvem TEV durante a vida. Os episódios trombóticos podem ser espontâneos, mas outras causas secundárias de trombose podem aumentar o risco de TEV, tais como: gravidez, puerpério, estrogênios, cirurgia, trauma e imobilização. Estudos mostram que a incidência de tromboembolismo venoso na associação de gravidez com deficiência de AT-III chega a 70%. A heparina subcutânea profilática deve ser considerada nesses casos. Os locais mais comuns de trombose são as veias dos membros inferiores, ilíacas, femorais, veias mesentéricas, veia cava inferior, veias do sistema porta. A trombose arterial é rara. Também é rara a forma homozigota e, nos poucos casos relatados, o defeito provoca tanto trombose venosa como arterial de intensa gravidade.

A deficiência de AT-III é a trombofilia genética mais grave, podendo aumentar o risco trombótico em até 10 vezes, comparando-se com pessoas sem a mutação.

A prevalência estimada da deficiência de AT-III na população geral sadia é de aproximadamente 0,02% enquanto em pacientes com TEV está presente entre 4% e 5%.

É importante enfatizar que os recém-nascidos têm a metade da concentração de AT-III do adulto e atingem níveis equivalentes aos das pessoas adultas a partir do 6º mês de vida.

As pessoas que apresentam tromboembolismo venoso decorrente da deficiência de AT-III devem ser tratadas com heparina de forma similar aos pacientes com TEV de outras etiologias. A associação de concentrado de antitrombina III é o ideal para os casos de trombose maciça, mas o alto custo dessa modalidade de tratamento dificulta sua indicação no nosso meio. A resistência à heparina é citada, mas não chega a ser um problema significante no manuseio do paciente com deficiência de AT-III e tromboembolismo. Geralmente os pacientes respondem bem à heparinoterapia, aumentando de forma conveniente o tempo da tromboplastina parcial ativada (PTTA).

Várias condições patológicas podem reduzir a concentração de AT-III no plasma: coagulação intravascular disseminada (CID), hepatopatia, síndrome nefrótica, sepse, trauma, queimaduras, neoplasias e circulação extracorpórea podem ser causas secundárias de deficiência de AT-III. Uma discreta redução pode, também, ocorrer no uso de anticoncepcional, na reposição hormonal e na trombose aguda. Nessa última condição ocorre um consumo de AT-III no episódio trombótico e, por isso, não se recomenda dosar a antitrombina III nesse momento sob o risco de obter-se um falso resultado com níveis baixos desse inibidor. A administração de heparina provoca, também, redução nos níveis plasmáticos de AT-III e o contrário ocorre com a ingestão de anticoagulante oral. Dados de vários estudos sugerem que uma diminuição na concentração plasmática de AT-III abaixo de 60% a 70% do normal representa um risco muito alto para desenvolver TEV. Um estudo de pacientes com síndrome nefrótica mostrou que 8 de 11 pacientes desenvolveram trombose quando a concentração de AT-III estava abaixo de 70%, enquanto apenas 1 de 37 com AT-III maior que 70% apresentou trombose.

DEFICIÊNCIA DE PROTEÍNA C

A deficiência de proteína C (PC) como causa de trombofilia foi descrita pela primeira vez por Griffin em 1981. A proteína C é uma glicoproteína com PM de 62.000 daltons, sintetizada no fígado, dependente da vitamina K e de participação muito importante no mecanismo inibitório da coagulação através de sua ativação pelo complexo trombina-trombomodulina. Sob condições fisiológicas a PC é convertida em proteína C ativada (PCA) pelo complexo trombina-trombomodulina na superfície do endotélio vascular e posteriormente a PCA inativa os fatores Va e VIIIa, retardando assim o mecanismo de coagulação e prolongando o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA).

No tipo I da deficiência da PC, ocorre uma redução quantitativa e funcional da molécula e no tipo II, apenas um defeito funcional. O mecanismo inibitório diminui e a cascata da coagulação continua a função, levando a uma maior geração de trombina e consequentemente ao tromboembolismo venoso (TEV).

Na avaliação laboratorial é preferível optar por um método funcional (p. ex.: coagulométrico ou por substrato cromogênico) e não imunológico, já que este último método não detecta defeito funcional da PC. Os níveis de proteína C são baixos nos recém-nascidos e vão aumentando na adolescência até a idade adulta.

A deficiência de proteína C ocorre em aproximadamente 5% dos pacientes com TEV e está presente em 0,2% a 0,4% da população geral. O risco de trombose aumenta de 4 a 5 vezes nos portadores dessa deficiência. O risco de episódios trombóticos aumenta com a idade nos heterozigotos e aproximadamente a metade dos pacientes apresenta tromboembolismo até a idade de 40 anos. A transmissão se faz através de um gene autossômico dominante

O quadro clínico mais encontrado na deficiência de PC é o TEV e com relativa frequência pode-se encontrar trombose em locais não usuais, como veias mesentéricas, sistema porta, veias hepáticas (síndrome de Budd-Chiari), veias renais e veias cerebrais. Casos de AVC isquêmico em adultos jovens estão associados com deficiência da PC. A deficiência homozigota de proteína C apresenta uma complicação trombótica muito agressiva ao nascimento, manifestando-se como púrpura fulminante, maciça trombose venosa e coagulação intravascular disseminada (CID). Nessa catastrófica síndrome o tratamento de escolha é a imediata reposição de proteína C, através da infusão de plasma fresco ou a reposição de concentrado da PC. O tratamento posterior se faz com anticoagulante oral durante o resto da vida.

Uma síndrome clínica relacionada com uma diminuição drástica da concentração da PC é a necrose de pele

induzida pela varfarina. O quadro clínico mais usual é aquele em que o paciente com deficiência heterozigota da PC desenvolve TEV quando é tratado com anticoagulante – geralmente quando se inicia a varfarina sem a proteção da heparina. Com a administração de varfarina todos os fatores dependentes da vitamina K diminuem numa intensidade que depende da dose de varfarina e da meia vida dos fatores (II, VII, IX e X, proteína C e proteína S). Como a meia vida da proteína C (aproximadamente 5 horas) é menor do que a maioria dos outros fatores citados, a concentração plasmática cai dramaticamente e predispõe ao tromboembolismo. O mais importante é quando a concentração da PC já é baixa antes de iniciar a administração da varfarina e após a anticoagulação o nível da PC cai rapidamente para próximo de 0%, principalmente quando se inicia o tratamento com dose alta de varfarina. Nessa situação é necessário que seja suspensa a varfarina rapidamente e que logo se inicie a infusão da PC, através de concentrado ou de plasma fresco congelado. Baseado nessa fisiopatologia é recomendável iniciar todo tratamento com anticoagulante oral em dose baixa e com proteção da heparina.

Vários fatores podem interferir no diagnóstico laboratorial da deficiência da PC. A gravidez e o uso de anticoncepcional oral podem elevar o nível plasmático da PC. Níveis diminuídos podem ser encontrados na trombose aguda, hepatopatias, doença renal, fumantes, CID e nos pacientes em uso de varfarina. Nesse ultimo caso os pacientes indicados ao estudo devem colher o sangue para a dosagem da proteína C somente 20 dias após a suspensão da varfarina.

DEFICIÊNCIA DE PROTEÍNA S

A deficiência de proteína S (PS) relacionada com trombose foi descrita pela primeira vez em 1984 por Comp. Assim como a proteína C, a PS é uma glicoproteína dependente da vitamina K, PM de 69.000 daltons e é sintetizada no endotélio vascular, no hepatócito e em outros tecidos. Atua como cofator da PC na degradação dos fatores Va e VIIIa. A PS circula sob uma forma inativa (60%), ligada à proteína C4b (C4b-BP), e outra livre (40%). Somente a forma livre da PS apresenta atividade como cofator da PC e as concentrações absolutas e relativas da PS livre são muito influenciadas pela quantidade de C4b-BP.

A deficiência da PS é transmitida por um gene autossômico dominante e os pacientes heterozigotos apresentam um risco de TEV 4 a 5 vezes maior que a população normal. A prevalência, na população geral, é estimada em 0,16% a 0,21% e nos indivíduos com tromboembolismo a prevalência é de aproximadamente 5%.

Há três tipos de deficiência da PS: o tipo I é caracterizado por uma concentração baixa tanto da proteína S total quanto da livre, o tipo II apresenta uma concentração normal de ambas as formas, mas com diminuição da atividade de cofator (defeito funcional), e o tipo III mostra uma concentração normal da forma total com redução na concentração da PS livre.

O diagnóstico laboratorial da deficiência da PS baseia-se mais na dosagem da PS livre do que na medida dos níveis da PS total. Variações nos resultados de dosagem da PS são frequentes, em parte explicadas pelas diferenças étnicas, variações de técnicas e oscilações provocadas pelo sexo, idade e estado hormonal. Os testes para a dosagem da PS consistem em métodos de exames imunológicos e testes funcionais para a avaliação da deficiência da PS. Os exames só devem ser efetuados 20 dias após a suspensão da varfarina ou após um episódio trombótico.

Várias condições fisiológicas e clínicas afetam o nível de PS livre e deficiências adquiridas são comuns. A mulher tem níveis ligeiramente mais baixos do que os homens. Durante a gravidez, a proteína S livre cai no segundo trimestre, em contraste à proteína C, que não se altera durante a gravidez. A proteína S total diminui nas pacientes que fazem uso de anticoncepcional oral, mas como também cai a concentração de C4b-BP, não há mudança na proteína S livre. Outras deficiências adquiridas de proteína S ocorrem na hepatopatia, infecção por varicela, tromboses extensas, administração de varfarina, CID e no lúpus eritematoso sistêmico. Na síndrome nefrótica ocorre um aumento da PS total, mas como a C4b-BP também aumenta, o nível de PS livre diminui para aproximadamente 75% do normal. Há relatos, também, de redução dos níveis da PS no HIV.

A deficiência da PS manifesta-se clinicamente por TEV e possivelmente com alguns casos de trombose arterial. A possibilidade de um indivíduo permanecer livre de trombose até a idade de 45 anos é de 50% nos pacientes portadores de deficiência da PS e com um alto risco de trombose quando associada a outros fatores de risco genéticos. Alem da trombose venosa profunda e do embolismo pulmonar, outras manifestações são encontradas, tais como: trombose da veia cerebral, mesentérica, do sistema porta, subclávia e púrpura fulminante. A trombose arterial ocorre mais na deficiência da PS do que na deficiência da PC, e a deficiência da PS livre tem sido encontrada associada com anticorpos anticardiolipina em pacientes com ataque isquêmico transitório e AVC.

Como a PS é um cofator para a proteína C ativada (PCA) na sua ação antitrombótica e sua síntese hepática depende da vitamina K, não é surpreendente que a PS esteja implicada na necrose de pele induzida pela varfarina e na púrpura fulminante neonatal, quando os níveis se aproximam de 0%.

A conduta terapêutica é similar à da deficiência da PC, exceto que o concentrado da PS não é disponível para o tratamento.

FATOR V DE LEIDEN

Até 1993 a avaliação laboratorial para investigar causas hereditárias de trombose era pouco gratificante. A descoberta da resistência à proteína C ativada (RPCA), por Dahlback, aumentou em 2 a 3 vezes as causas genéticas de trombofilia em relação à soma das outras alterações descritas anteriormente. Ele descreveu três famílias cuja proteína C ativada (PCA) não provocava o esperado prolongamento no PTTA e

isso definiu um novo fenótipo chamado de RPCA. Logo em seguida, Bertina identificou uma mutação genética especifica no gene do fator V, alteração esta responsável por 95% da RPCA. Essa mutação, primeiramente identificada na cidade de Leiden, na Holanda, recebeu o nome de Fator V de Leiden. As deficiências da proteína C e da proteína S provocam uma diminuição da inativação dos fatores Va e VIIIa permitindo, portanto, uma coagulação mais acelerada e podendo culminar com tromboembolismo venoso (TEV). O mesmo acontece na RPCA, na qual ocorre uma ausência de prolongação do tempo de tromboplastina parcial ativada (PTTA) mesmo com a adição da proteína C ativada (PCA) ao plasma do indivíduo com RPCA.

O fator V de Leiden é uma mutação caracterizada por uma troca de arginina na posição 506 por glutamina. Esse defeito produz uma resistência à clivagem do fator Va pela PCA, o que resulta na produção de altos níveis de trombina e uma grande probabilidade de trombose. A mutação do fator V de Leiden é responsável por cerca de 90% dos casos de RPCA. Os 10% restantes responsáveis pela RPCA são em decorrência do fator V de Cambridge (arg por thr), uma alteração genética que parece ter pouco risco de trombose e algumas causas adquiridas, como a gravidez, o uso de anticoncepcional oral, neoplasias e o aumento na taxa do fator VIII. O mecanismo da RPCA nessas causas adquiridas permanece sem esclarecimento.

A prevalência do FV_{Leiden} é alta na população branca, mas baixa nos nativos da Ásia, África e Austrália. A frequência do FV_{Leiden} na população branca é de aproximadamente 5%. O FV_{Leiden} é muito raro na China, Coreia, Taiwan e Japão. Nos Estados Unidos é encontrado em 2,21% dos americanos hispânicos, em 1,23% dos americanos africanos, em 0,45% dos americanos asiáticos e em 1,25% dos índios americanos. O risco de TVP em portadores heterozigotos é, aproximadamente, cinco vezes maior do que na população controle. Nos pacientes selecionados com TEV, a prevalência do FV_{Leiden} varia entre 20% e 40%, conforme a etnia de origem do paciente. Estudos familiares e de caso controle mostram que o FV_{Leiden} é claramente um estado trombofílico mais moderado do que as deficiências heterozigotas da AT-III, da PC e da PS. O risco absoluto de TEV em pessoas com deficiência de AT-III, PC e PS está entre 0,5% e 1,5% por ano, comparado com 0,1% a 0,3% por ano nos portadores heterozigotos do FV_{Leiden}. Com base nesses dados, a probabilidade estimada de, ao longo da vida, ocorrer trombose nos portadores heterozigotos do FV_{Leiden} está entre 5% e 10%. Um estudo efetuado em 15.109 indivíduos entre 18 e 65 anos de idade sugeriu que a mutação do FV_{Leiden} poderia ser responsável por aproximadamente 7% de todos os casos de TEV.

A prevalência do FV_{Leiden} homozigoto, na população geral, é de aproximadamente 1 caso para 2.500 pessoas. As complicações trombóticas são muito menos graves do que nos pacientes homozigotos para as deficiências da PC e da PS. O FV_{Leiden} homozigoto foi encontrado em 4,1% de 1.200 pacientes consecutivos, jovens, com TEV. Nos pacientes homozigotos, o risco de trombose venosa aumenta de 30 a 140 vezes.

A trombofilia está caracterizada como uma doença multigênica e é comum a interação do FV_{Leiden} com outros defeitos genéticos, como a deficiência da PC, a deficiência da PS e da mutação no gene da protrombina e essas associações aumentam em muito o risco trombótico.

O tromboembolismo venoso geralmente tem início na fase adulta e fatores circunstanciais podem desencadear a TEV, como a imobilização, pós-operatório, gravidez ou uso de anticoncepcional. A trombose também pode ocorrer em sítios atípicos, tais como seio sagital cerebral e veia central da retina. A perda fetal e natimorto ocorrem com alta frequência e apresentam um risco estimado de 16% por gravidez. O uso de anticoncepcional oral aumenta o risco de tromboembolismo em aproximadamente 3,7 vezes em relação às pacientes que não utilizam o hormônio, e quando combinado com o FV_{Leiden} o risco aumenta para 35 vezes. Em relação à trombose arterial e a RPCA, os dados ainda não são conclusivos, embora alguns trabalhos sugiram um risco maior de infarto do miocárdio em pacientes jovens fumantes nos portadores da mutação, assim como uma incidência maior de AVC em adultos jovens e crianças. Outros estudos, entretanto, falharam na demonstração do aumento do risco de trombose arterial. O diagnóstico de RPCA geralmente é baseado no PTTA e o método é calcado na comparação dos resultados na presença ou ausência de PCA, com o resultado final expresso por uma razão que mede o índice de sensibilidade do plasma do paciente à PCA. Os indivíduos que são portadores da RPCA apresentam um PTTA curto ao passo que as pessoas normais mostram um PTTA prolongado após a adição de PCA ao plasma testado. Esse teste deve ser muito bem padronizado dentro de cada laboratório para que se possa valorizar o resultado.

Os pacientes em uso de varfarina podem apresentar resultados falsamente normais, já que esse anticoagulante pode prolongar o PTTA. Para corrigir essa interferência e para aumentar a sensibilidade do teste, foi sugerida uma modificação no método que consiste numa pré-diluição (1 + 3) do plasma do paciente com plasma deficiente em fator V. Essa diluição do plasma do paciente com o plasma deficiente em fator V fornece quantidades ótimas dos fatores de coagulação e corrige o efeito do anticoagulante. Essa prova apresenta uma sensibilidade de 96% e especificidade de 100%. O teste da resistência à proteína C ativada tem a vantagem de detectar as formas raras de RPCA não causadas pelo FV_{Leiden}, mas para identificar a mutação genética (fator V de Leiden) é necessário a biologia molecular.

O tratamento dos pacientes portadores do FV_{Leiden} depende do quadro clínico. Os portadores assintomáticos não necessitam de anticoagulação. Naqueles que já apresentaram um episódio trombótico, o risco de recorrência é maior do que na população normal, mas a decisão de se fazer a anticoagulação depende da extensão, da gravidade da TEV e da presença ou não de fatores precipitantes. Nos pacientes assintomáticos que são descobertos acidentalmente ou durante um estudo familiar, a anticoagulação somente será recomendada para eventos de alto risco, como: após cirurgia, durante períodos de imobilização, durante uso de anticoncepcional oral e durante e após a gravidez (Figura 62.2).

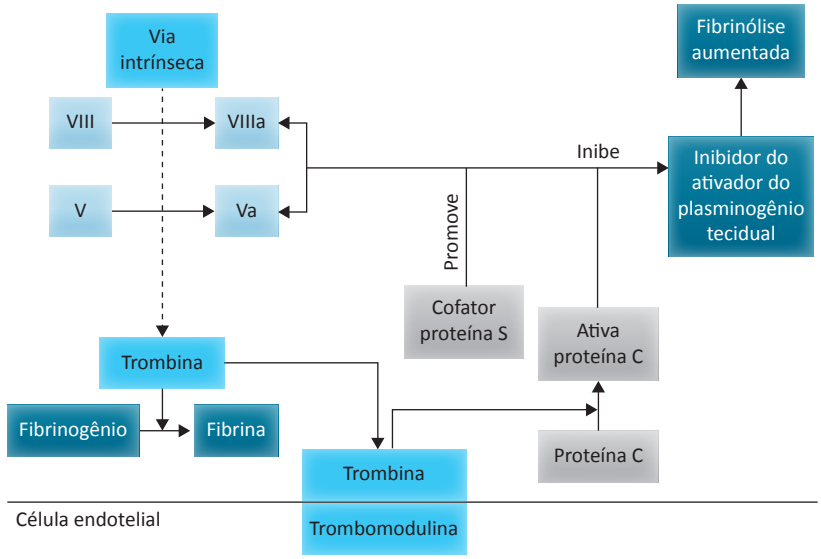


Figura 62.2 Sistema proteína C e S.
Fonte: A Victor Hoffbrand; Jhon E Pettit., 2000.

MUTAÇÃO NO GENE DA PROTROMBINA

Em 1966, Poort descreveu outra mutação genética responsável por um aumento no risco de doença, a substituição da base (G por A) na região 3' – UNTRANSLATED (posição 20210) do gene da protrombina, o que proporciona um risco trombótico de 2 a 3 vezes maior.

Em 474 pacientes não selecionados com o primeiro episódio de trombose venosa e 474 controles do LETS, a frequência da mutação foi de 6,2% e 2,3%, respectivamente. Essa mutação da protrombina está associada com um aumento significativo nos níveis do fator II (protrombina) em comparação com as pessoas não portadoras (132% e 105%, respectivamente). O nível plasmático da protrombina é um fator de risco independente para trombose. Esse fator de risco sugere que a FII 20210 atua aumentando os níveis do fator II (protrombina), culminando com um aumento da geração da trombina.

A prevalência da mutação da protrombina (FII G20210A) é alta na população branca, mas é baixa ou zero nos asiáticos, nos índios americanos e nos americanos africanos. A prevalência estimada da FII G20210A, na população branca, está entre 1% e 6%. Essa mutação é mais frequente no sul da Europa do que no norte, ao contrário do que ocorre com o FV_{Leiden}. O risco de trombose venosa profunda está de 3 a 4 vezes aumentado nos heterozigotos comparado com os não portadores dessa mutação. Nos pacientes com TEV selecionados, a prevalência da FII G20210A é de aproximadamente 16%.

Dois estudos mostram um aumento da recorrência da trombose venosa entre os portadores heterozigotos da FII G20210A, mas outros estudos contestam esse aumento. Assim como no FV_{Leiden}, a associação de FII G20210A com trombose arterial seria muito fraca. A maioria dos estudos não tem mostrado associação entre FII G20210A e infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral (AVC). No entanto, em populações de baixo risco de eventos trombóticos arteriais, tais como em mulheres jovens, a taxa de probabilidade está aumentada em quatro vezes para o infarto do miocárdio, nas portadoras de FII G20210A. Uma metanálise de três estudos em pacientes com infarto do miocárdio antes dos 55 anos mostrou uma taxa de probabilidade de 1,86 para a FII G20210A. Mais de uma dúzia de trabalhos analisaram a associação entre a mutação FII G20210A e AVC, mas nenhum deles mostrou uma ligação com isquemia cerebral. O risco de trombose venosa cerebral está aumentado em portadoras da mutação FII G20210A. Embora a FII G20210A heterozigota provoque um aumento de 30% nos níveis plasmáticos de protrombina em relação aos não portadores, esse fenótipo não pode identificar os portadores da mutação devido a larga margem nos níveis da protrombina. A única maneira de identificar a mutação é por meio da biologia molecular.

HIPER-HOCISTEINEMIA

A associação entre uma elevação significativa nos níveis de homocisteína plasmática (> 100 μmol/L) e arteriosclerose e doença arterial trombótica foi observada por McCully em 1969. Posteriormente, níveis menos elevados de homocisteína plasmática (16 a 100 μmol/L) foram relacionados com tromboembolismo venoso (TEV), tanto de causa genética como de causa adquirida.

O metabolismo da homocisteína envolve dois mecanismos maiores, sendo que ambos requerem vitaminas como cofatores – vitaminas B_{12}; B_6 e ácido fólico. A transulfuração converte a homocisteína em cistationina através da enzima cistationina β-sintetase (CBS) e da vitamina B_6, e uma reme-

tilação converte a homocisteína em metionina envolvendo a enzima metileno-tetra-hidrofolatorredutase (MTHFR), que é folato dependente. A deficiência ou defeito de uma dessas enzimas resulta em hiper-homocisteinemia. Embora uma mutação genética na CBS explique muitos casos de homocistinuria, sua prevalência na população geral é de apenas 0,3%, enquanto a mutação no gene da MTHFR, que produz um defeito termolábil na molécula, está presente, na forma homozigota, em 10% a 13% da população caucasiana. A deficiência de folato, vitamina B_6 e vitamina B_{12} prejudica a remetilação da homocisteína pela qual a MTHFR atua ou pela transulfuração operacionalizada através da CBS. Em ambos os casos, a homocisteína se acumula no sangue em correlação inversa à concentração de folato. A administração de 4 mg/dia de ácido fólico aos pacientes com hiper-homocisteinemia reduz o nível para aproximadamente 25%, a vitamina B_{12} diminui o nível para 7%, e a vitamina B_6 não interfere na taxa de homocisteína. O mecanismo pelo qual a homocisteína provoca trombose não está totalmente esclarecido, mas não há nenhuma dúvida de que a hiper-homocisteinemia provoca trombose tanto venosa como arterial. A disfunção endotelial ou a indução da atividade do fator tecidual, a proliferação das células musculares lisas, um defeito nos mecanismos da prostaciclina e do óxido nítrico, a inibição da ligação do ativador do plasminogênio tecidual às células receptoras e a inibição da ativação da proteína C através da trombomodulina são algumas das hipóteses sobre a trombogênese da hiper-homocisteinemia. Estudos em primatas efetuados por Harker, em 1976, sugerem que a combinação desses efeitos seja importante para a homocisteína induzir lesões tóxicas sobre o endotélio, sobre a musculatura lisa e sobre o estreitamento do vaso.

Estudos com casos e controles mostram uma correlação entre níveis discretamente a moderadamente elevados de homocisteína e risco de TEV, apresentando um risco relativo de 2 a 4. Simione e Den Heijer encontraram um leve aumento de homocisteína em 5% a 10% da população sadia e que esse modesto aumento implicou num risco de TEV duas vezes maior. Em pacientes que já apresentaram trombose, o risco de recorrência é maior nos indivíduos com homocisteína elevada do que em pessoas com níveis normais: 18,2% *versus* 8,1% (risco relativo de 2,7). Interessante é a resposta de pacientes com hiper-homocisteinemia grave ao tratamento com vitaminas, através do qual, uma redução da doença arterial é seguida de um decréscimo na taxa de homocisteína. A conclusão final é de que a hiper-homocisteinemia moderada é considerada um fator de risco isolado, tanto para trombose arterial como venosa.

A elevação na taxa de homocisteína plasmática é comum, particularmente no idoso. A deficiência de vitaminas (ácido fólico, B_{12} e B_6) é uma causa determinante das hiper-homocisteinemias leves e moderadas, ocorrendo em aproximadamente dois terços de todos os casos. Uma metanálise recente de 38 estudos avaliou o risco de hiper-homocisteinemia para doença vascular arteriosclerótica, estimou a redução dos níveis de homocisteína pela administração de ácido fólico e calculou o potencial de redução da mortalidade por doença coronariana através do aumento da ingestão de ácido fólico. Essa análise conclui que a elevação da homocisteína é um fator de risco independente para doença vascular arteriosclerótica e a fortificação com ácido fólico na alimentação reduz a mortalidade. A suplementação de vitaminas reduz, também, a recorrência de tromboembolismo venoso.

SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDE

Introdução

A síndrome antifosfolípide (SAF) é uma condição trombofílica definida por um conjunto de manifestações clínicas e laboratoriais. A SAF foi primeiramente descrita em 1952 com um relato de um teste sorológico falso-positivo para sífilis e um inibidor do tempo de tromboplastina parcial ativada (PTTA). Em 1957 foi descrita uma associação entre o teste falso-positivo para sífilis, um anticoagulante circulante e abortos recorrentes. A ausência de sangramento e a associação paradoxal entre esses inibidores da coagulação e trombose foi relatado em 1963. O termo anticoagulante lúpico (AL) para esses inibidores dependentes de fosfolipídeos foi introduzido porque a maioria dos pacientes iniciais pareciam ter lúpus eritematoso sistêmico, embora esses achados não fossem confirmados por estudos posteriores. Em 1980, os exames de imunoensaio foram desenvolvidos para a pesquisa dos anticorpos anticardiolipina (aCL), e uma nova síndrome de trombose, aborto e doença neurológica foi chamada de síndrome anticardiolipina, termo posteriormente corrigido para síndrome antifosdolípide. No início de 1990, foi descoberto que os anticorpos, nessa condição trombótica autoimune, não reconheciam os fosfolipídeos sem um cofator proteico identificado como β_2-glicoproteína I (β_2GPI), e que outras proteínas ligadas ao fosfolipídeo poderiam realizar esse papel. Esses anticorpos foram relatados na literatura como cofatores-dependentes ou anticorpos aPL dependentes de β_2GPI, em contraste aos anticorpos gerados em pacientes com sífilis e outras infecções.

O critério atual de investigação de SAF, chamado de Critério de Sydney, não teve a pretensão de ter requisitos absolutos para o diagnóstico clínico. Esses critérios incluem história de trombose documentada e/ou complicações gestacionais definidas juntamente com provas laboratoriais específicas (Tabela 62.3).

Uma proporção significativa de pacientes com trombose venosa apresenta níveis elevados de anticorpos antifosfolipídeos (aPL), com prevalência estimada entre 5% e 30% para qualquer anticorpo aPL, 1% e 16% para AL e 4% e 24% para anticorpo anticardiolipina (aCL). Nas pacientes com abortos espontâneos recorrentes, a prevalência é estimada em 11% para AL e 29% para anticorpos aCLA. A prevalência de anticorpos aPL na população normal assintomática foi estimada em 3% a 10% com uma prevalência de 1% a 5% para AL, 1% a 5% para anticorpos aCL e 3% para anticorpos β_2GPI. Os anticorpos aPL que ocorrem após infecções, geralmente, não estão associados com trombose. Uma proporção de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico tem anticorpos aPL positivos, assim como outras doenças autoimunes. Em alguns pacientes, a presença dos anticorpos aPL pode anunciar o aparecimento do lúpus.

Tabela 62.3 Critérios de investigação de Sydney para o diagnóstico de SAF.

- Trombose vascular (um ou mais episódios de trombose arterial, venosa ou de pequenos vasos). Na histologia não deve haver nenhuma evidência de inflamação na parede dos vasos.
- Morbidades da gravidez atribuídas à insuficiência placentária, incluindo: a) três ou mais abortos espontâneos recorrentes, antes da décima semana de gestação; b) uma ou mais perdas fetais após a décima semana de gestação; c) natimorto; d) episódios de pré-eclâmpsia, trabalho de parto prematuro, descolamento prematuro da placenta, crescimento intrauterino restrito e oligoidrâmnio inexplicável.
- Títulos médios ou altos de anticorpos anticardiolipina ou anti-β_2GPI IgG e/ou IgM presente em duas ou mais ocasiões, em pelo menos 12 semanas de intervalo, medidos por Elisa.
- Presença de anticoagulante lúpico em duas ou mais ocasiões com pelo menos 12 semanas de intervalo.

Fonte: Victor Marder; *et al*., 2013.

Uma série de mecanismos foram postulados para explicar a tendência trombótica na SAF (Tabela 62.4).

Tabela 62.4 Patogenia da SAF.

- Inibição de inibidores da coagulação e da fibrinólise
  1. Rompimento da barreira de proteção da anexina
  2. Inibição do mecanismo da proteína C
  3. Aumento da geração da trombina e diminuição da sua inativação
  4. Inibição dos heparinoides TFPI e inibição da inativação do FIXa
- Ativação das plaquetas
- Injúria e ativação das células endoteliais e monócitos
- Ativação do complemento

Fonte: Victor Marder; *et al*., 2013.

Embora os pacientes possam apresentar tromboembolismo venoso e/ou arterial em virtualmente qualquer parte do sistema vascular, a maioria tende a ter eventos tromboembólicos venosos. Em um estudo, 59% tinham trombose limitada à circulação venosa, 28% somente na área arterial e 13% em ambos. A TVP dos membros inferiores foi o mais frequente achado, ocorrendo em cerca da metade dos pacientes; outros locais de TVP incluem a embolia pulmonar, veias cava, subclávia, jugular e veias abdominais e pélvicas. Assim como nos pacientes sem SAF, as tromboses podem ocorrer espontaneamente ou na presença de fatores de risco, tais como estrogênios, contraceptivos orais, gravidez, puerpério, estase vascular, cirurgia ou trauma. Alguns pacientes com trombose venosa, mas geralmente não com trombose arterial, também podem apresentar simultaneamente condições trombofílicas hereditárias. O fator de risco mais significante para um evento tromboembólico futuro é uma história anterior de tromboembolismo. O risco de recorrência aumenta para aproximadamente 30% em pacientes com o primeiro episódio de TEV e a presença de anticorpos aCL durante quatro anos de observação do evento inicial.

Duas classes de exames são utilizadas para a detecção dos anticorpos aPL: 1. Exames de coagulação, em que o AL é detectado através da inibição do fosfolipídeo; e 2. Imunoensaios em que os anticorpos antifosfolipídeos são pesquisados e cofatores proteicos que são detectados por Elisa. A anticardiolipina (aCL) IgG e IgM são exames mais sensíveis, mas menos específicos; a anti-β_2GPI IgG e IgM são mais específicos, mas menos sensíveis; e o anticoagulante lúpico (AL) é o menos sensível, mas o mais especifico.

ANTICOAGULANTE LÚPICO

Há várias formas de pesquisar o AL, todas relacionadas com a inibição do aPL. Esses exames são baseados em modificações do PTTA, testes com reagentes sensíveis e não sensíveis para AL, o tempo de coagulação com Kaolin (KCT), o dRVVT e a inibição do tempo de tromboplastina diluída (ITTD). Os resultados dos testes para AL podem ser tão variáveis que mesmo laboratórios especializados podem emitir resultados discordantes. Apesar dessas limitações, a presença de AL é mais preditiva e mais especifica para a ocorrência de trombose ou perda fetal do que a anticardiolipina. Em uma revisão sistemática da literatura, 12 de 12 estudos mostraram uma associação significativa entre AL e trombose, enquanto somente 15 de 28 estudos mostraram significativa associação entre aCL e trombose. No estudo APASS, a positividade para LA e aCL juntos, mas não para aCL somente, mostrou um valor preditivo mais alto para risco de fenômenos trombóticos em pacientes com o primeiro AVC isquêmico. No estudo RATIO, a presença de LA apresentou um fator de risco maior para eventos trombóticos arteriais em mulheres jovens, como infarto do miocárdio, AVC isquêmico, para mulheres em uso de contraceptivos orais e para fumantes.

O Subcomitê de Anticorpos Antifosfolípides da Sociedade Internacional de Hemostasia e Trombose priorizou uma adequação para o LA nas seguintes categorias:

- **baixa adequação:** pacientes mais velhos com tromboembolismo venoso ou arterial;
- **moderada adequação:** pacientes assintomáticos com, casualmente, um PTTA prolongado e pacientes com perda fetal precoce espontânea recorrente ou TEV provocada;
- **alta adequação:** paciente com TEV espontânea e inexplicável, trombose arterial em pacientes jovens (< 50 anos), trombose em locais atípicos, perda fetal tardia e

trombose ou morbidade durante a gravidez com doenças autoimunes.

Diretrizes pormenorizadas foram propostas para padronizar todos os aspectos do teste para AL, desde a coleta do sangue, a centrifugação, preservação, execução técnica, até a interpretação. Dois diferentes testes para LA com princípios diferentes são necessários. O tempo do veneno da víbora de Russell diluído – *diluted Russell viper venom time* (dRVVT) – é especifico para detectar o AL em pacientes com alto risco de trombose. O PTTA com sílica como ativador e baixa concentração de fosfolipídeo é o segundo teste de escolha.

EXAMES USADOS PARA PESQUISAR OS ANTICORPOS ANTIFOSFOLIPÍDEOS

Tempo do veneno da víbora de Russell diluído (dRVVT)

O dRVVT usa o veneno da cobra de Russel em um sistema contendo limitadas quantidades de fosfolipídeo diluído obtido do cérebro de coelho. O veneno da cobra de Russell ativa diretamente o fator X da coagulação, promovendo a formação do coágulo de fibrina. O AL prolonga o dRVVT interferindo com a construção do complexo da protrombinase e o prolongamento é revertido com a adição de excesso de fosfolipídeo. O tratamento com heparina, varfarina ou inibidores diretos da trombina podem alterar falsamente os resultados.

Tempo de tromboplastina parcial ativada (PTTA)

O prolongamento do PTTA detecta alguns anticoagulantes lúpicos (ALs), e um PTTA prolongado em pessoas saudáveis, até que se prove o contrário, é devido ao LA. Quando o PTTA está prolongado e não corrige com mistura com plasma normal, um LA deve ser suspeitado, especialmente se o paciente não apresentar sintomas hemorrágicos. O LA precisa ser diferenciado de inibidores de fatores específicos da coagulação (p. ex.: inibidor do fator VIII) e de anticoagulantes como a heparina. Quando o PTTA normaliza após a adição de um excesso de fosfolipídeo, sugere-se o LA.

Anticorpo anticardiolipina

O imunoensaio para aCL foi desenvolvido, inicialmente, para quantificar o teste falso-positivo para sífilis. Na aCL por Elisa, a quantidade de IgG e IgM é expressa em unidades de fosfolipídeo IgG (GPL) ou unidades de fosfolipídeo IgM (MPL). A maioria dos pacientes com SAF é identificada por níveis elevados de anticorpos aCL, um teste com alta sensibilidade, mas pouca especificidade, principalmente nos pacientes assintomáticos. Tem uma variabilidade sazonal interessante, com mais pessoas saudáveis tendo aumento de anticorpos aCL no inverno do que no verão.

Altos níveis de aCL estão associados ao aumento do risco de trombose venosa, enquanto qualquer nível elevado está associado com infarto do miocárdio ou AVC isquêmico. Mulheres com uma IgG > 20 GPL ou um AL positivo apresentaram um risco maior para SAF. Uma metanálise sobre anticorpos antifosfolipídeos (aPL) em mulheres com perda fetal recorrente mostrou uma correlação significativa à presença de aumento de aCL IgG.

Com respeito ao AVC isquêmico, níveis elevados de aCL IgG ou IgM foram relacionados com um fator de risco significante. Os anticorpos aPL são, também, um fator de risco independente para AVC isquêmico em mulheres jovens.

Anticorpo anti-β_2GPI

O β_2GPI é principal alvo antigênico para os anticorpos aPL. Embora os anticorpos β_2GPI estejam presentes em combinação com aCL anormal, alguns pacientes com SAF apresentam somente anticorpos β_2GPI. Apesar da sua destacada alta especificidade (98%) para SAF, o anti-β_2GPI não pode sozinho ser utilizado para o diagnóstico por causa de sua baixa sensibilidade (40% a 50%) e variabilidade interlaboratorial. Testes simultâneos são necessários.

TRIAGEM PARA TROMBOFILIA

Não há um consenso para a triagem da trombofilia, que tipos de exames fazer ou o tratamento clínico para os pacientes com trombofilia. A trombofilia está mais associada principalmente ao tromboembolismo venoso do que à trombose arterial. A trombose venosa ocorre mais frequentemente como trombose venosa profunda e/ou embolia pulmonar. As formas clínicas menos comuns, tais como tromboses dos membros superiores, cerebral e trombose de veias viscerais (p. ex.: portal, mesentérica, hepática e renal) devem ser triadas porque estão frequentemente associadas à trombofilia. O valor preditivo de uma história familiar para identificar pacientes com estado trombofílico e a ausência de uma história familiar não excluem a necessidade de triagem do FV_{Leiden}, FII G20210A e da deficiência dos inibidores da coagulação (AT-III, PC e PS). A natureza multifatorial do TEV deve ser considerada porque os eventos trombóticos em portadores de fatores trombofilicos são desencadeados, na metade dos casos, por fatores de risco adquiridos. Portanto, um TEV associado com um fator de risco adquirido não exclui a necessidade da triagem para trombofilia. Faz sentido limitar a triagem após o primeiro evento trombótico para pacientes jovens ou que apresentaram recorrência depois da retirada do anticoagulante oral. Os testes para trombofilia são úteis quando capazes de identificar pacientes que são particularmente propensos para recorrência.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. A Victor Hoffbrand e Jhon E Pettit. Atlas Colorido de Hematologia Clínica , 3a Ed. 2000; 294
2. A Victor Hoffbrand e Jhon E Pettit. Atlas Colorido de Hematologia Clínica , 3a Ed. 2000; 649
3. Bauer KA. The thrombophilias:well-defined risk factors with uncertain therapeutic implications. Ann Intern Med. 2001;123(5)367-73.

4. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resisntance to activated protein C. Nature. 1994;369(6475):64-7.
5. D`Amico EA, Junqueira PL. Trombofilias Adquiridas. 665-74.
6. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofator to activated protein C. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(3):104-1008.
7. De Paula EV, Annichino-Bizzacchi JM. Tromboses Arteriais In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. São Paulo: Atheneu, 2013. p.685-91.
8. Egberg O. Thrombophilia caused by inherited deficiency of blood antithrombin. Scand J Clin Lab Invest. 1965;76:651-62.
9. Emmerich L, Rosendaal FR, Cattaneo M, et al. Study Group for pooled-analysis in venous thromboembolism – pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Thromb Haemost. 2001;83(3):809-16.
10. Galli M, Luciani D, Bertolini G, et al. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipd syndrome: a systematic rewiev of the literature. Blood. 2003;101(5):1827-32.
11. Kyrle PA, Rosendaal FR, Eichinger S. Risk assessment for recorrent venous thrombosis. Lancet. 2010;376:2032-9.
12. Lane DA, Mannuci PM, Bauer KA, et al. Inherited thrombophilia: Part 1. Throm Haemost. 1996;76:651-2.
13. Levine SR, Brey RL, Tilley BC, et al. Antiphospholipid antibodies and subsequent thrombo-occlusive events in patients with ischemic stroke. JAMA. 2004;291(5)576-84.
14. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on na update of classification criteria for definite antiphospho lipd syndrome (APS). J Thromb Haemost. 2006;4(2):295-306.
15. Morelli VM, Lourenço DM. Trombofilia. In: Figueiredo MS, Kerbauy J, Lourenço DM. Hematologia – Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar da UNIFESP- EPM. São Paulo: Editora Manole, 2011. p.317-21.
16. Morelli VM. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. São Paulo: Atheneu, 2013. p.675-84.
17. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, et al. Clinical course of high--risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. J Tromb Haemost. 2010;8(2):237-42.
18. Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al. Update of the guidelines for measuring a presence of Lupus Anticoagulant. J Thromb Haemost. 2009;7:1737-40.
19. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, et al. A common genetic variation in the 3´- untranslated régio of the phtrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and na increase in nenous thrombosis. Blood. 1996;88(10):3698-703.
20. Rezende SM. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Tratado de Hematologia. São Paulo: Atheneu, 2013. p.659-64.
21. Rosendaal FR. Venous Thrombosis: a multicasual disease. Lancet. 1999;353(9159):1167-73.
22. Urbanus RT, Siegering B, Roest M, et al. Antiphospholipid antibodies and risck of myocardial infarctation and ischaemic stroke in Young womem in the RATIO study: a case-control study. Lancet Neurol. 2009;8(11):998-1005.
23. Victor Marder, et al. Hemostasis and Thrombosis; 2013, sixth edition, 963.
24. Victor Marder et AL. Hemostasis and Thrombosis; 2013, sixth edition, 1217
25. Victor Marder et AL. Hemostasis and Thrombosis; 2013, sixth edition, 1219

PARTE

11

Micologia

Paulo Murillo Neufeld

63

capítulo

Paulo Murillo Neufeld

Diagnóstico Laboratorial das Infecções Fúngicas

INFECÇÕES FÚNGICAS

As infecções fúngicas podem ser de aquisição comunitária ou hospitalar e, menos frequentemente, venérea e ocupacional. Em geral, pelo baixo contágio entre os indivíduos, os processos comunitários são mais endêmicos do que epidêmicos. Contudo, surtos de menor incidência podem ocorrer. Como as principais vias de infecção são a inalação de elementos infectantes e a implantação traumática, o pulmão, a pele e seus anexos e as membranas mucosas são os sítios anatômicos mais acometidos. No entanto, infecções disseminadas a outros órgãos internos podem surgir de focos pulmonares primários. Na grande maioria das vezes, por serem inumocompetentes, os hospedeiros apresentam quadros clínicos de caráter mais benigno, os quais, normalmente, respondem bem à quimioterapia antifúngica. Processos como paracoccidioidomicose, histoplasmose, coccidioidomicose, esporotricose, candidíases superficiais, criptococose e dermatofitoses são os mais observados em nosso meio.

Recentemente, tem sido relatado o aumento da frequência de infecções fúngicas invasivas em pacientes hospitalizados. Como apresentam algum comprometimento do seu sistema de defesa, esses pacientes se tornam suscetíveis a diversos agentes oportunistas que, apesar da limitada capacidade patogênica, têm demonstrado resistência crescente às drogas antifúngicas de uso clínico, produzindo quadros mórbidos importantes, com taxas de mortalidade elevadas. Nesse caso, as vias de infecção dos organismos nosocomiais estão, principalmente, relacionadas aos procedimentos iatrogênicos. As candidíases hematogênicas e a aspergilose invasiva são os processos de maior incidência no grupo dos pacientes imunocomprometidos e hospitalizados.

Importa mencionar que a definição de infecção fúngica invasiva compreende classicamente três elementos principais, representados pelos fatores relacionados ao hospedeiro, fatores clínicos e fatores microbiológicos. Associados à amostra clínica (lavado broncoalveolar, biospsia e secreções), esses fatores permitem o estabelecimento de níveis de probabilidade de infecção (provada, provável e possível). Os fatores ligados ao hospedeiro e os fatores clínicos são prontamente discerníveis, já que são rotineiramente empregados para o reconhecimento de pacientes de risco. Do mesmo modo, os critérios microbiológicos não apresentam maiores dificuldades para sua aplicação, pois são tradicionalmente baseados na demonstração tecidual dos agentes etiológicos e na cultura dos espécimens clínicos.

Um conjunto de critérios fisiopatológicos permite a determinação de cada um desses três fatores. Para os fatores do hospedeiro, por exemplo, podem estar presentes:

- neutropenia (< 500 neutrófilos/mm^3 por > 10 dias);
- febre persistente/resistente (> 96 h) à antibioticoterapia;
- temperaturas < 36 °C ou > 38 °C, com algumas das seguintes condições predisponentes: neutropenia prolongada (> 10 dias) e prévia (60 dias anteriores), infecção fúngica provada ou provável nos episódios iniciais de neutropenia, uso recente/concomitante de agentes imunossupressores ou coexistência de Aids sintomática;
- corticoterpia prolongada (> 3 semanas) e prévia (60 dias anteriores);
- doença enxerto contra hospedeiro aguda (grau ≥ 2);
- extensa doença crônica.

Para os fatores clínicos, sendo considerada ou não a existência de manifestações clínicas principais (≥ 1) ou secundárias (≥ 2), podem ser observadas:

- infecção do trato respiratório inferior (imagem na tomografia computadorizada revelando sinal do crescente aéreo, sinal do halo ou cavidades com áreas de consolidação, sintomas de infecção apresentando tosse, dor no peito, hemoptise ou dispneia, achados clínicos de atrito pleural, efusão pleural ou outros infiltrados);
- infecção nasal e dos seios nasais (evidência radiológica de infecção nos seios nasais com erosão da parede dos seios nasais, extensa infecção de estruturas adjacentes ou extensa destruição da base do crânio, sintomas de infecção em trato respiratório superior com descarga nasal,

congestão, ulceração da mucosa nasal ou epistaxe, inchaço periorbital, dor temporomandibular, lesões necróticas negras e/ou perfuração do palato duro);
- infecção do sistema nervoso central (evidência radiológica de infecção no SNC com mastoidites ou outro foco parameningeal, empiema extradural, massa no parênquima cerebral ou coluna vertebral, sintomas neurológicos focais, convulsões, hemiparesia, paralisia, confusão mental, sintomas de irritação de meninges, alteração bioquímica e celular do líquido cefalorraquidiano);
- Infecção fúngica disseminada (lesões cutâneas nodulares ou papulares sem causa determinada, achados intraoculares sugestivos de coriorretinite hematogênica fúngica ou endoftalmite);
- Candidíase disseminada crônica (abscessos pequenos e periféricos no fígado e/ou baço, demonstrados por tomografia ou ultrassonografia ou elevado nível de fosfatase alcalina) ou candidemia.

Relativamente aos fatores microbiológicos, devem ser criteriosamente considerados:

- resultados positivos para cultura de escarro ou lavado broncolaveolar para fungos filamentosos (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. ou Zigomycota), *Cryptococcus neoformans* e patógenos endêmicos;
- resultados positivos para cultura ou exame microscópico direto/histopatologia de aspirados de seios nasais para fungos filamentosos;
- resultados positivos para exame microscópico direto/histopatologia de escarro e lavado broncoalveolar para fungos filamentosos ou *Cryptococcus* spp.;
- resultados positivos para antígenos de *Aspergillus* em lavados broncoalveolares, líquido cefalorraquidiano e amostras de sangue (≥ 2);
- resultados positivos para antígenos de *Cryptococcus* no sangue;
- resultados positivos para elementos fúngicos em exame microscópico direto/histopatologia de espécimens estéreis (*Cryptococcus* spp. em líquido cefalorraquidiano);
- resultados positivos para antígenos de *Histoplasma capsulatum* no sangue, urina ou líquido cefalorraquidiano;
- resultados positivos (= 2) de cultura de urina para leveduras na ausência de cateter urinário;
- elementos de *Candida* spp. em urina, também na ausência de cateter urinário;
- resultados positivos para *Candida* spp. em hemocultura.

Recentemente, o *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI/USA) publicou o documento M54-A que representa um guia orientativo para o estudo micológico da amostra clínica, no que se refere ao exame direto, à histopatologia e ao isolamento fúngico em cultura. Parâmetros de controle de qualidade e critérios interpretativos dos resultados também estão disponíveis nesse protocolo. Em decorrência da enorme quantidade de organismos fúngicos (3,5 a 5 milhões de espécies) e da grande complexidade dos pacientes imunocomprometidos, a utilização de protocolos micológicos padronizados fornece diagnósticos laboratoriais mais precisos, o que contribui para a redução de condutas clínicas inadequadas.

Pela precocidade e rapidez do diagnóstico, as técnicas de avaliação por imagem e as técnicas de detecção de antígenos têm sido cada vez mais valorizadas, sendo colocadas atualmente no mesmo nível dos critérios microbiológicos, apesar de serem métodos indiretos de evidenciação. As técnicas de detecção de ácidos nucleicos, contudo, por não estarem ainda padronizadas interlaboratorialmente, podem não ser consideradas métodos validados de diagnóstico.

Os sinais e sintomas de infecção fúngica invasiva raramente são específicos e testes micológicos convencionais, com frequência, não são suficientes para o diagnóstico. Apoiadas nos fatores do hospedeiro, fatores clínicos e fatores microbiológicos, foram formuladas três categorias de probabilidade de infecção: provada, provável e possível.

A categoria de provada infecção é composta por critérios que permitem que a infecção fúngica invasiva seja diagnosticada de maneira definitiva. Desse modo, o mais alto nível de certeza no diagnóstico é dado pela determinação da presença do fungo no tecido. Para alguns agentes, contudo, a detecção de antígenos tem sido aceita como um critério de provada infecção. Nessa categoria, estão presentes, invariavelmente, fatores do hospedeiro, fatores clínicos e fatores microbiológicos.

As categorias de provável e possível infecção apresentam um conjunto de informações suficientes para sugerir uma infecção fúngica invasiva e subsidiar o estabelecimento de algumas formas de terapia antifúngica empírica. Pacientes dessas categorias são, frequentemente, febris, a despeito da antibioticoterapia de largo espectro, e podem ter um foco potencial de infecção. Para uma infecção ser considerada provável, o nível de consideração dos critérios é menos profundo, apesar dos três elementos (fatores do hospedeiro, fatores clínicos e fatores microbiológicos) estarem presentes. Nessa categoria provável, os fatores microbiológicos tendem a ser mais inconsistentes (antigenemia). Em relação à categoria possível, o critério associado ao hospedeiro está presente, mas há ausência de um dos outros dois fatores, isto é, fatores clínicos ou fatores microbiológicos. Particularmente para os fatores microbiológicos, estes podem estar ausentes, em decorrência de terem sido negativos ou não terem sido realizados. Há uma tendência, entretanto, a se considerar apenas como infecção possível aquela condição em que estão presentes os fatores do hospedeiro e os fatores clínicos com evidências imaginográficas, deixando de ser classificados nessa categoria os casos onde, mesmo havendo a presença de fatores clínicos, estes ocorrem sem o diagnóstico por imagem. Além disso, tem sido também menos aceito como infecção possível a condição clínica constituída apenas pelos fatores do hospedeiro e pelos fatores microbiológicos.

ADIASPIROMICOSE (HAPLOMICOSE)

Etiologia e epidemiologia

Adiaspiromicose é tipicamente uma infecção pulmonar decorrente da inalação de esporos assexuados de *Emmonsia* sp. A doença é mais comum em animais do que em seres

humanos, sendo ocasional nestes últimos. As espécies fúngicas *Emmonsia crescens* e *Emmonsia parva* são consideradas os únicos agentes etiológicos dessa enfermidade. Apesar das duas espécies causarem doença animal, apenas *E. crescens* determina doença humana. Em sua fase sapróbia, *Emmonsia* spp. apresenta um aspecto filamentoso com hifas hialinas e septadas e com a produção de números conídios hialinos, esféricos e de pequenas dimensões (3 a 3,5 μm), denominados aleuroconídios. Os aleuroconídios, ao serem inalados e atingirem a intimidade do parênquima pulmonar, aumentam de forma considerável seu tamanho, passando a serem chamados de adiásporos. Essas estruturas são arredondas, de paredes espessas (10 a 70 μm), sem conteúdo citoplasmático; medem cerca de 10 a 500 μm de diâmetro. Com base no tamanho dessas estruturas, pode-se fazer a distinção entre *E. crescens* e *E. parva*, pois, enquanto os adiásporos de *E. crescens* medem de 50 a 500 μm, os de *E. parva* medem de 10 a 40 μm. A despeito da alteração no tamanho, em função da elevada temperatura tecidual, os adiásporos não germinam e não se reproduzem, bem como não se disseminam a focos alhures, ficando localizados no sítio de implantação pulmonar. Esse tipo de crescimento tem sido demonstrado tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Em função dessa caraterística, os nomes adiaspiromicose e adiásporo, que vêm do grego *Adia*, conecta à ideia de "aumento sem multiplicação". Além dos esporos assexuados, *Emmonsia* sp. pode, ainda, se reproduzir sexuadamente, originando ascos com ascósporos. O estágio sexual desse fungo tem sido descrito como *Ajellomyces*. O gênero *Ajellomyces* é membro da ordem Onygenales e da família Onygenaceae, que contêm, igualmente, o estágio sexual do *Blastomyces dermatitides* e do *Histoplasma capsulatum*, o que revela uma ligação filogenética estreita com os fungos dimórficos.

O hábitat natural desse fungo é o solo, bem como parece ser essa a principal fonte de infecção. A distribuição da adiaspiromicose animal e humana tem caráter cosmopolita, sendo encontrada em áreas desérticas, tropicais e semiáridas, incluindo países da América do Norte e América Latina, como Estados Unidos, Guatemala, Honduras, Venezuela e Brasil; da Europa, como França, República Tcheca e Rússia; da Oceania, como Austrália; e da África e Ásia, como Quênia e Índia. Claramente, a doença animal é preponderante. Os animais mais acometidos são aqueles que fazem tocas ou ninhos no solo. A enfermidade é muito comum em roedores (esquilos, coelhos, ratos, camundongos), marsupiais (gambás), edentados (tatús, tamaduás), topeiras, doninhas, lontras e pequenos carnívoros e insetívoros. A inalação de aleuroconídios é a principal via de infecção tanto para animais quanto para o homem. Contudo, tem sido relatado que o contato com águas contaminadas de áreas endêmicas pode redundar em infecção de mucosas. Os animais carnívoros ou necrófagos (urubus e abutres), contudo, parecem desempenhar também um papel importante na disseminação dos adiásporos contidos nos tecidos dos animais infectados que lhes servem de alimento, pois essas estruturas sobrevivem à passagem pelo trato gastrintestinal, chegando viáveis no solo, por meio das fezes, dando início, dessa forma, a um novo ciclo sapróbio, com a produção de micélio e conídios. Outra situação que contribui para a disseminação fúngica nos ambientes é a morte dos animais infectados e doentes que, entrando em processo de decomposição, permite que a fase micelial fúngica se desenvolva no solo circundante. Relativamente à doença humana, essa é principalmente pulmonar, mas infecções oculares, cutâneas e disseminadas têm sido descritas. A forma pulmonar é autolimitada, benigna e localizada, com pouco ou nenhum sintoma. A gravidade da infecção, todavia, é dependente da quantidade de elementos fúngicos inalados. Em termos ocupacionais, pescadores, nadadores, fazendeiros, profissionais de limpeza e militares têm sido considerados os mais afetados, por entrarem em contato com poeira ou água contaminada de locais como silos, celeiros e galpões, regiões de manobras militares, rios e lagos. Os fatores predisponentes são todos aqueles associados ao comprometimento da imunidade e à ocorrência de doenças pulmonares crônicas como patologias de base.

Clínica e patologia

Normalmente, restritos aos pulmões, os esporos inalados não se deslocam, duplicam ou espalham, mas aumentam de tamanho cerca de 100 vezes ou de volume na ordem de 10^4 vezes. As lesões são observadas nos espaços endobronquiais e alveolares. Por causa das características do esporo nos tecidos, a clínica e a mortalidade da adiaspiromicose depende quase exclusivamente do grau de exposição aos elementos fúngicos. Em geral, há uma pequena reação celular com infiltrado inflamatório em torno do adiásporo em desenvolvimento. No caso de exposição intensa, podem ser formados granulomas localizados. A ocorrência de infecção assintomática é o mais comum. Não obstante a doença ser autolimitada e benigna, alguns pacientes apresentam um início indolente, com tosse não produtiva, febre, perda de peso, fraqueza, astenia, mal-estar geral, dispneia e creptação à auscultação. Tem sido relatada, ainda, dor à respiração, hemoptise, calafrios e suores noturnos. A radiografia e a tomografia computadorizada de tórax exibem múltiplos nódulos com milímetros de diâmetro, semelhante a uma tuberculose miliar. A infecção tem um curso progressivo sobre semanas e meses. A progressão pode levar à morte. Há relatos, entretanto, de cura espontânea. A adiaspiromicose pulmonar tem como facilitadores: tuberculose, silicose, linfoma, neoplasia de bexiga, metástases neoplásicas, bronquite crônica, enfisema dependente de esteroides, fibrose intersticial, enfarte do miocárdio, miocardite crônica e aneurisma aterosclerótico. A forma sistêmica pode estar associada à doença de pele, ossos e medula óssea, osteomielite, sinusite, conjuntivite e endocardite. Entretanto, o acometimento extrapulmonar é pouco comum.

Tem sido relatada uma infecção rara, causada por outra espécie de *Emmonsia*: a *Emmonsia pasteurina*, caracterizada por um quadro pulmonar, conjuntivite e forma disseminada. Essa enfermidade tem caráter oportunista, acomentendo principalmente pacientes com Aids, com contagens de CD+ < 100 células/mm^3. As manifestações clínicas incluem sudorese, febre, perda de peso, linfoadenopatia e hepatoesplenomegalia.

Lesões de pele são comuns a todos os pacientes e se caracterizam por apresentar um aspecto pápulo-crostoso, úlceras e verrugas na região da face, no tronco e nas extremidades.

Diagnóstico laboratorial

- **Exame direto e histopatologia:** o diagnóstico de adiaspiromicose é geralmente realizado pela observação tecidual dos adiásporos, a partir de biópsias pulmonares. Em preparações histopatológicas com hematoxilina e eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS) e Gromori-Grocott (prata), se observam células ovaladas ou elongadas, de paredes espessas, grandes (até 500 μm), com perda de conteúdo citoplasmático ou com um aspecto granular. A utilização de hematoxilina e eosina (HE) permite a visualização do processo inflamatório e do granuloma onde se encontram os adiásporos circundados por neutrófilos e eosonófilos. É importante diferenciar as esférulas jovens de *Coccidioides immitis/Coccidioides posadasii* e *Rhinosporidium seeberii*.
- **Cultura:** os isolados fúngicos, em sua fase sapróbia, podem ser recuperados em meios micológicos de rotina como o ***á***gar de Sabouraud dextrosado (SDA) ou o ágar de batata dextrosado (BDA), ambos sem cicloeximida. Em temperatura de 25 °C, surgem, em duas a três semanas, colônias filamentosas, glabras, velutinas, lanosas ou pulverulentas, esbranquiçadas, acinzentadas, amareladas, alaranjadas ou amarronzadas, planas, lisas, aumentadas no centro ou radialmente dobradas, com ou sem gotas de exsudato e com uma margem glabrosa ou irregular. O reverso da colônia é acinzentado ou amarronzado. Na morfologia microscópica, observa-se um micélio septado, delgado, conídios arredondados, simples ou em pequenas cadeias (formação de conídios secundários), com espículas ou rugosos, que se desenvolvem diretamente das hifas (sésseis) ou em ramificações e prolongamentos em ângulo reto. Quando cultivados a 37 °C, verificam-se os adiásporos ovais ou globosos típicos para cada um dos dois agentes, sendo que o adiásporo de *E. crescens* é 5 a 10 vezes maior do que o de *E. parva*. Importa mencionar ainda que os adiásporos de *E. parva* são uninucleados e os de *E. crescens* são multinucleados e que, ao germinar por vários sítios, este último produz múltiplas hifas, o que lembra leveduras multibrotantes de *Paracoccidioides brasiliensis*. Dependendo da espécie fúngica, há também diferenças frente à resposta para temperaturas elevadas. Nesse sentido, *E. parva* tem um máximo de crescimento em torno de 40 °C, enquanto *E. crescens*, cresce até 37 °C. Não tem sido isolado de escarros e lavados broncoalveolares.

  Emmonsia parva Ciferri et Montemartini 1959.
  - **Morfologia macroscópica:** colônias com crescimento moderado (2,5 a 5 cm/2 semanas/25 °C) brancas a castanho-amareladas no centro, delgadas, com aspecto de tapete, zoneada ou com ligeira ranhuras radiais. O reverso da colônia é creme ou bege. Crescem a 20 °C a 25 °C, chegando até a 40 °C. Hifas aéreas podem se desenvolver em corêmios. Os esporos são do tipo tálico ou aleuriósporos, mas podem ser do tipo blástico também. Os conídios são hialinos, finamente rugosos e subglobosos (3 a 3,5 μm), sendo produzidos em pequenos conidióforos que se ramificam em ângulo reto ou diretamente na hifa vegetativa, em sua porção lateral. Esses conídios podem estar isolados ou em pequenas cadeias (três células) que surgem sobre hastes ampuliformes ou hifas irregularmente entumescidas.
  - **Adiásporos:** à temperatura de 37 °C, os conídios se tornam tumefeitos e as hifas se tornam irregularmente distorcidas e dilatadas. As hifas se desintegram a 40 °C e os conídios aumentam de tamanho, espessam a parede celular (> 2 μm) e se tornam adiásporos uninucleados, medindo de 10 a 25 μm de diâmetro.

  Emmosia crescens Emmons et Jellison 1960.
  - **Morfologia macroscópica**: é semelhante à colônia de *E. parva*.
  - **Morfologia microscópica:** seus conídios são ligeiramente maiores (2 a 4 × 2,5 a 4,5 μm) do que os da *E. crescens,* mas sua estrutura micromorfológica é fundamentalmente semelhante ***à*** da espécie *crescens*. A 37 °C, as hifas também se desintegram e seus conídios se tornam tumefeitos, transformando-se em adiásporos. Esses adiásporos são multinucleados, sendo produzidos em um arranjo radial, a 37 °C (10 a 12 dias), mas não a 40 °C. Ao serem incubados a 25 °C a 30 °C (4 a 8 dias), os adiásporos germinam em vários sítios, produzindo diversos pequenos tubos germinativos ou hifas. Ao retornarem a 37 °C, esses tubos germinativos se tornam adiásporos esféricos secundários.

Diagnóstico diferencial

Para as formas pulmonares, deve-se diferenciar de tuberculose, coccidioidomicose, neoplasia pulmonar, bronquites e fibrose. Nas formas oculares, a distinção deverá ser procedida com conjuntivites virais e bacterianas. As formas cutâneas devem ser diferenciadas de esporotricose, tuberculose e outras infecções por micobactérias.

Prognóstico e tratamento

O prognóstico é bom a reservado, em decorrência da situação clínica do paciente. Curas espontâneas são, frequentemente, descritas. O fungo é sensível a derivados azólicos como cetoconazol, itraconazol, tiabendazol e voriconazol, caspofungina e anfotericina B associada com 5-fluorocitosina. Cirurgias e corticoterapia podem ser necessárias.

ASPERGILOSE

Etiologia e epidemiologia

A aspergilose é um importante processo clínico causado por membros do gênero *Aspergillus* e que, em geral, está

associada com pacientes imunocomprometidos. Atualmente, cerca de 200 espécies são descritas, todavia, um limitado número tem sido isolado de casos de micoses humanas. Em termos taxonômicos, o *Aspergillus* sp. pertence ao grupo de fungos anamórficos com fase sexuada em Ascomycota. A micromorfologia vegetativa e de reprodução assexuada é constituída de hifas septadas hialinas, conidióforos com vesículas e fiálides (cabeças aspergilares), conídios e células de Hülle. Os conídios são a principal estrutura de propagação e infecção. Esses fungos são de distribuição universal e sapróbios de diversos substratos, sendo, principalmente, encontrados sobre material orgânico em decomposição, solo, ar e água.

Em unidades de tratamento intensivo, a presença de *Aspergillus* sp. no ar e, recentemente, na água de abastecimento, tem sido considerada crítica. *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans, A. niger* e *A. terreus* são as espécies mais relatadas na literatura como agentes de micoses oportunistas. Contudo, diferenças na frequência e nos padrões de infecção e sensibilidade aos antifúngicos têm sido descritas. O *A. fumigatus* é a espécie mais comum em infecções invasivas, estando implicada em mais de 90% dos casos. No entanto, o *A. flavus* está mais associado às infecções dos seios paranasais. Resistência à anfotericina B e elevadas taxas de mortalidade têm sido relacionadas ao *A. terreus*. O *A. nidulans* é mais observado em complicações da doença granulomatosa crônica e o *A. niger* é, comumente, encontrado como um contaminante do trato gastrintestinal.

Clínica e patologia

Os elementos principais de infecção são conídios e hifas que atingem a intimidade dos tecidos do hospedeiro frequentemente por via respiratória. A manifestação clínica dos processos patológicos está condicionada não só à virulência dos fungos, mas fundamentalmente à baixa capacidade de defesa do organismo. Na verdade, a aspergilose pode ser definida de maneira genérica como um complexo de condições anatomoclínicas no qual está envolvido o *Aspergillus* sp. Dentre essas diversas entidades clínicas, destacam-se a aspergilose saprofítica ou aspergiloma, doença alérgica (aspergilose broncopulmonar alérgica e sinusite alérgica), aspergilose semi-invasiva ou crônica necrosante, aspergilose invasiva das vias aéreas (traqueobronquite aguda, bronquiolite, broncopneumonia e aspergilose broncopulmonar obstrutiva) e aspergilose angioinvasiva.

Tipicamente, o aspergiloma (bola fúngica) é formado por um conglomerado ou massa de hifas, muco e debris celulares dentro de cavidades pulmonares aeradas, que surgem como sequelas de tuberculose, histoplasmose, sarcoidose, cisto broncogênico entre outros. Na realidade, não há invasão de parênquima, e, sim, colonização dessas cavidades. Em geral, os aspergilomas são unilaterais e localizados no lobo superior dos pulmões, no entanto, envolvimentos bilaterais têm sido relatados. A principal manifestação clínica é a hemoptise, todavia, com frequência, essa condição é assintomática. Também pode ocorrer a colonização dos seios paranasais sem invasão da mucosa, em pacientes com longa história de sinusite crônica.

A aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) ocorre, frequentemente, em pacientes com história de asma brônquica. Essa condição é uma síndrome caracterizada por asma, infiltrado pulmonar transiente, bronquiectasia proximal e fibrose pulmonar. Sintomas agudos incluem chiado, mal-estar, febre, tosse produtiva, dor ao respirar. A aspergilose alérgica pulmonar crônica pode cursar com pneumonia recorrente. Pacientes com ABPA demonstram proeminente reação de hipersensibilidade dos tipos I e III ao *Aspergillus* sp. O fungo se desenvolve no espaço intraluminal, determinando a constante produção de antígenos. Ocorre uma reação de hipersensibilidade do tipo I com liberação de imunoglobulinas E e G. Células da resposta inflamatória e imunocomplexos são depositados sobre a parede bronquial, produzindo necrose e infiltrado eosinofílico, com destruição da mucosa e bronquiectasia, em uma reação de tipo III. O aumento da produção de muco e a alteração da função ciliar deteminam impactações. Frequentemente, tampões de muco podem ser liberados com a tosse. Por sua vez, a sinusite alérgica ocorre em indivíduos atópicos com manifestações de rinossinusite e, algumas vezes, asma. Essa condição é caracterizada por um processo inflamatório de natureza alérgica, dentro da cavidade sinusal, com edema, obstrução e polipose, bem como produção de mucina alérgica. Em indivíduos que apresentam alterações nos mecanismos de defesa, a sinusite invasiva aguda ou crônica pode ser uma importante complicação com destruição óssea e comprometimento de órbita e encéfalo.

A presença de necrose tecidual e inflamação granulomatosa é observada na aspergilose crônica necrosante. Essa forma de aspergilose parece estar relacionada a pacientes com moderado grau de imunossupressão. Diabetes melito, doença pulmonar obstrutiva crônica, corticoterapia prolongada e senilidade são as principais condições de base. Processos necrosantes também têm sido descritos, após a resolução da neutropenia. Clinicamente, a doença tem um caráter insidioso, cursando com tosse crônica e produtiva, hemoptise, febre e sintomas constitucionais. Da mesma forma, o *Aspergillus* sp. pode causar infecções localizadas na traqueia e nos brônquios. A aspergilose invasiva de vias aéreas é caracterizada pela presença de lesões inflamatórias, obstrutivas com atelectasias e infiltrados bilaterais no lobo inferior dos pulmões e invasão da membrana bronquial, como também produção de muco. Pacientes gravemente neutropênicos, como aqueles submetidos a transplantes alogênicos e os aidéticos compõem a população de risco. Todavia, indivíduos com integridade de seu sistema imunológico têm sido também acometidos. O comprometimento tecidual pode estar associado a uma traqueobronquite ou a uma aspergilose pulmonar invasiva. A clínica desse processo inclui chiado, tosse, hipóxia, febre e hemoptise. A aspergilose angioinvasiva também ocorre quase que exclusivamente em pacientes que se encontram em profunda neutropenia. A incidência dessa infecção tem aumentado em face de melhorias das técnicas de suporte e tratamento de doenças neoplásicas sólidas e hematológicas, além dos pro-

cedimentos cirúrgicos e de transplante. Caracterizam o processo angioinvasivo a invasão do parênquima pulmonar e a destruição e oclusão de artérias de médio e pequeno calibre, com infartos e formação de nódulos hemorrágicos e necróticos. A sintomatologia dessa entidade clínica é variável, mas febre, hemoptise, tosse e dor pleural podem estar presentes. A aspergilose disseminada pode ocorrer por via hematogênica ou contiguidade.

Outros processos incluem dermatomicoses, ceratomicoses, onicomicoses e otomicoses e manifestações sistêmicas como endocardites, endofitalmites, osteomielites e infecções em vísceras extrapulmonares (cérebro, estômago, fígado, baço e rins), próteses e biomateriais. Além disso, intoxicações alimentares ou micotoxicoses decorrentes da ingestão de metabólitos secundários fúngicos (micotoxinas), liberados sobre os alimentos, podem ser também produzidas por diferentes espécies de *Aspergillus*.

Diagnóstico laboratorial

A determinação do diagnóstico de aspergilose em pacientes com falhas de seus mecanismos de defesa é dificultada porque, frequentemente, a apresentação clínica é inespecífica e os sinais e sintomas sugestivos de infecção surgem em um estágio avançado da doença. Além disso, o fungo nem sempre é isolado de sangue, fluidos corporais e espécimens pulmonares e testes sorológicos podem ser inconclusivos. Por isso, a suspeita clínica associada a fatores de risco e dados epidemiológicos são de grande importância. Comumente, técnicas mais invasivas de coleta (punções, biópsias e fibrobroncospia) e métodos não culturais de identificação são necessários para o diagnóstico.

- **Exame direto e histopatologia:** elementos hifálicos nos materiais clínicos podem ser visualizados em preparações a fresco e com KOH a 10% ou calcoflúor branco. Hifas septadas e hialinas em arranjos paralelos ou radiais e ramificações dicotômicas em ângulos de 45º são observadas nessa prova. Outros agentes de micoses oportunistas, como *Fusarium* sp., *Scedosporium* sp., *Pseudoallescheria boydii* e, algumas vezes, Zygomycota, podem produzir uma morfologia tecidual semelhante. A presença de conidióforos com vesículas e fiálides (cabeças aspergilares) e estruturas hifálicas nas amostras respiratórias caraterizam o aspergiloma. As técnicas histopatológicas mais utilizadas para a observação de hifas e corpos de frutificação são hematoxilina e eosina (HE), bem como o ácido periódico de Schiff (PAS) e Gromori-Grocott (prata) que é insatisfatório em tecidos necrosados. O fenômeno de Splendore-Hoeppli tem sido descrito, ocasionalmente, em espécimens de pulmão e fígado. A confirmação dos achados teciduais é feita pela cultura dos espécimens clínicos.
- **Cultura:** o isolamento de *Aspergillus* sp.de espécimens de pulmão apresenta um elevado valor preditivo positivo (82%) naqueles pacientes comprometidos imunologicamente. Contudo, particularmente para esse fungo, a possibilidade de contaminação ambiental ou colonização dos tecidos deve ser considerada. A significância clínica dos resultados micológicos aumenta com o isolamento repetido do agente. Nos meios habituais de cultivo, o *Aspergillus* sp. demonstra um rápido e fácil crescimento. O ágar de Sabouraud dextrosado (SDA) ou ágar malte com antibóticos e sem cicloheximida é normalmente empregado para cultura de espécimens obtidos de sítios contaminados, enquanto os mesmos meios livres de antimicrobianos são utilizados para espécimens estéreis. A incubação deve ser feita a 37 ºC, por dois a três dias. Após esse período, o desenvolvimento de uma colônia tipicamente algodonosa é detectado. A produção de estruturas microscópicas atípicas ou ausência de esporulação pode ocorrer em cultivos primários. Para a identificação e caracterização dos isolados, os subcultivos devem ser procedidos. A taxonômia do *Aspergillus* sp. está baseada em suas estruturas coloniais e de frutificação. Os aspectos empregados na definição desse grupo incluem a cor e forma dos conidióforos, forma da vesícula, número de fiálides e morfologia das cabeças aspergilares, bem como cleistotécios, ascósporos, células de Hülle e esclerócios.

  Aspergillus (Link) 1809.
  - **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é rápida, atingindo a maturidade em três dias. Algumas espécies apresentam um crescimento lento. A superfície da colônia é, inicialmente, branca, tornando-se creme ou bege, verde, azul, rosa, cinza, marrom ou negra, dependendo da espécie. A textura é velutina ou algodonosa. O reverso é branco, amarelo ou marrom.
  - **Morfologia microscópica:** as hifas são septadas e ramificados e medem de 2,5 a 8 μm. Os conidióforos são eretos, não ramificados, e surgem de células especializadas na hifa vegetativa, denominadas células basais ou podais. A partir de uma intumescência na extremidade, os conidióforos formam vesículas esféricas, ovais ou claviformes. As vesículas dão origem a uma ou duas séries de células conidiogênicas (fiálides) que cobrem totalmente ou parcialmente a sua superfície. As células conidiogênicas são em forma de frasco e produzem conídios (2 a 5 μm) hialinos ou pigmentados, globosos e, algumas, vezes rugosos. Certas espécies produzem esclerócios e clestotécios de coloração clara ou escura.
    - **Fase sexual:** *Eurotium* sp., *Neosartorya* sp., *Emericella* sp.
    - **Principais Espécies:** *A. flavus, A. fumigatus, A. glaucus, A. nidulans, A. niger, A. terreus* e *A. versicolor.*
- **Métodos não culturais:** o diagnóstico de aspergilose invasiva em pacientes neutropênicos pode ser feito pela detecção de galactomanas da parede celular do *Aspergillus* spp. em soro, plasma, urina, lavado broncoalveolar e líquido cerebroespinhal, utilizando-se a tecnologia de ELISA-Sandwich (Platela *Aspergillus*) ou da aglutinação em látex (*Pastorex Aspergillus*). O limite de detecção des-

se antígeno no soro pelo método do ELISA é de 0,5 a 1ng/mL e sua sensibilidade e especificidade estão em torno de 93% e 95%, respectivamente. Empregando o mesmo anticorpo, a prova do látex apresenta um limite de detecção de 15ng/mL. A aspergilose invasiva também pode ser diagnosticada pela detecção sérica de (1-3)-b--D-glucana da parede celular fúngica, por meio da ativação do fator G de coagulação de amebócitos *Limulus* (Fungitec G-Test). Essa prova tem mostrado uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 100% em pacientes com neoplasias hematológicas. A detecção de DNA de *Aspergillus* spp. circulante e em lavados broncoalveolares tem sido realizada pela metodologia da PCR e suas variações (Sistema PCR-ELISA). Alguns estudos demonstraram que resultados positivos para aspergilose invasiva podem ser obtidos com uma antecedência de até dois dias dos primeiros sinais e sintomas e de nove dias do diagnóstico clínico. A sensibilidade e especificidade da técnica em espécimens de sangue variam de 80% a 100%, e em espécimens pulmonares chegam a 94%. A confirmação do diagnóstico de aspergiloma pulmonar e aspergilose broncopulmonar alérgica pode ser feita pela detecção de anticorpos séricos específicos para antígenos, como catalase CATI (90kDa), quimiotripsina (79kDa), restritocina (18kDa) e galactomanana, pelas técnicas de imunodifusão, contraimunoeletroforese, bem como ELISA, radioimunoensaio e imunofluorescência indireta. A aspergilose invasiva, além do aspergiloma e aspergilose pulmonar alérgica, pode ser diagnosticada precocemente a partir de imagens em tomografia computadorizada. A presença do sinal do halo é altamente sugestiva de aspergilose invasiva em estágio inicial, em pacientes neutropênicos e febris. Outro achado radiográfico que surge mais tardiamente é o sinal do crescente aéreo, também fortemente relacionada à infecção invasiva dos pulmões pelo *Aspergillus* spp. A observação do sinal do halo e do sinal do crescente aéreo pode permitir o estabelecimento de uma quimioterapia antifúngica empírica e específica, respectivamente. Segundo a literatura, a visualização do sinal do halo em tomografia computadorizada realizada em pacientes com suspeita de aspergilose pulmonar invasiva pode reduzir o tempo de diagnóstico de sete para um dia, mas o fato do sinal do crescente aéreo aparecer em fase avançada do processo pulmonar limita o seu valor diagnóstico. De qualquer forma, o surgimento de um sinal do crescente aéreo subsequente ao sinal do halo e à terapia antifúngica denota recuperação do número de neutrófilos e um bom prognóstico. No entanto, a cavitação pulmonar produzida pela liquefação tecidual, decorrente da ação enzimática dos polimorfonucleares, pode levar a hemoptises fatais.

Diagnóstico diferencial

A aspergilose pulmonar invasiva aguda deve ser distinguida de outras pneumonias agudas que respondem pobremente à antibioticoterapia de largo espectro, como aquelas causadas por outros fungos, *Nocardia* sp., *Legionella* sp. e bactérias antibiótico-resistentes. Em indivíduos imunocomprometidos, sinusites invasivas devem ser distinguidas de mucoromicoses, pseudoallecheriose e infecção por *Pseudomonas aeruginosa*. Naqueles imunocompetentes, as infecções invasivas dos seios nasais devem ser distinguidas de carcinomas, mucocele e infecções por *Conidiobolus* sp., *Alternaria* sp., *Bipolaris* sp. e infecção crônica por *Staphylococcus* sp. O diagnóstico diferencial de aspergiloma pulmonar e aspergilose broncopulmonar alérgica pode ser feito a partir de provas sorológicas para a detecção de anticorpos (IgE e IgG) para antígenos aspergilares. No caso da doença alérgica, prostração, ausência de febre e leucose podem estar associadas.

Prognóstico e tratamento

O prognóstico dos processos determinados pelo *Aspergillus* sp. está associado ao tipo de doença causada e ao estado imunológico do paciente. A aspergilose invasiva em indivíduos imunocompetentes tem prognóstico reservado, porém, em pacientes imuniocomprometidos, a doença é extremamente grave, com elevadas taxas de mortalidade (100%). Em geral, a apergilose broncopulmonar alérgica e o aspergiloma são benignos, mas, ocasionalmente, podem complicar o quadro. Dependendo do grau de certeza do diagnóstico (provada, provável e possível), a terapia para a aspergilose pulmonar invasiva pode ser profilática, empírica ou específica. As drogas antifúngicas disponíveis são os derivados azólicos (cetoconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol), equinocandinas/pneumocandinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina) e anfotericina B deoxicolato ou suas formulações lipídicas (anfotericina B lipossomal, anfotericina B em complexo lipídico, anfotericina B em dispersão coloidal). As formulações lipídicas dos derivados poliênicos estão indicadas para aqueles pacientes que apresentam falhas da função renal ou desenvolvem nefrotoxicidade à anfotericina B deoxicolato. Terapias para a reconstituição imunológica também podem ser necessárias. A remoção cirúrgica da bola fúngica e a terapia com azoles são recomendadas para o aspergiloma. A doença alérgica deve ser tratada com corticosteroides na fase aguda e drogas azólicas.

BLASTOMICOSE NORTE-AMERICANA

Etiologia e epidemiologia

A blastomicose norte-americana é um processo sistêmico que acomete principalmente o pulmão, além de pele, ossos e articulações, aparelho geniturinário e próstata e sistema nervoso central. A micose é causada pelo *Blatomyces dermatitidis,* que é um organismo dimórfico, existindo na natureza como um fungo filamentoso de micélio septado e hialino e produtor de conídios, e nos tecidos como células de levedura esféricas, grandes (8 a 15 μm), com paredes espessas e unibrotantes. Esse fungo é um Ascomycota e seu teleomorfo é o *Ajellomyces dermatitidis*. O hábitat natural do *B. dermatitidis* parece estar restrito a solos úmidos, ricos em matéria orgânica

e com pH ácido de regiões de clima temperado com elevados índices pluviométricos. As áreas endêmicas mais importantes estão localizadas na América do Norte, incluindo Estados Unidos e Canadá. Outras áreas relatadas são África, Europa, Oriente Médio e Sudeste Asiático. Tipicamente, os pacientes acometidos são do sexo masculino, com idade entre 30 e 50 anos, que vivem e trabalham em atividades rurais nas áreas endêmicas. Em pacientes pediátricos, no entanto, a incidência é extremamente baixa. A maioria dos casos de blastomicose ocorre em indivíduos imunocompetentes, porém, a literatura tem relatado um envolvimento crescente de pacientes neutropênicos. A sensibilidade ambiental do *B. dermatitidis* e a escassez de provas sorológicas para a confirmação de infecções assintomáticas ou subclínicas, todavia, tem dificultado um melhor conhecimento ecoepidemiológico da doença e seu agente.

Clínica e patologia

A infecção ocorre, normalmente, após a inalação ou implantação traumática de conídios e outras estruturas do *B. dematitidis* no organismo do hospedeiro. A resposta inflamatória a essa infecção é granulomatosa e supurativa. Calcificação e necrose tecidual não estão presentes. Lesões antigas podem se apresentar fibrosadas. A blastomicose mostra uma grande variedade de aspectos clínicos gerais que, na maioria das vezes, são inespecíficos e não contribuem para o diagnóstico. Além disso, com muita frequência, o processo primário dos pulmões é assintomático. O *B. dermatitidis* pode causar infecção virtualmente em qualquer órgão, todavia, as principais formas clínicas são pulmonar, cutânea, óssea, genitourinária e meningoencefálica. O processo pulmonar é a manifestação mais comum. Normalmente, a doença cursa como uma pneumonia aguda com febre, calafrios, tosse, expectoração mucopurulenta, mialgia, artralgia, anorexia, perda de peso, astenia e dor torácica do tipo pleural. Com frequência, as infecções agudas curam de forma espontânea em 2 a 12 semanas, mas, algumas vezes, a doença pode retornar em outros sítios ou passar a uma fase crônica. A blastomicose pulmonar crônica apresenta uma persistência dos sintomas durante o transcorrer dos meses (2 a 6 meses), com tosse e expectoração purulenta, febre, suor noturno, astenia, anorexia, perda de peso, dor pleural e hemoptise. Essa condição é progressiva, não tendendo à remissão espontânea. Outros órgãos, como pele, ossos e aparelho geniturinário podem ser acometidos de maneira secundária, por disseminações metastásicas. A forma extrapulmonar mais frequente é a blastomicose cutânea, que, normalmente, é decorrente de um espalhamento hematogênico do fungo. Face, pescoço, tronco e extremidades são as áreas primariamente afetadas. Lesões verrucosas e ulceradas são os dois principais tipos de lesões cutâneas observadas. A forma verrucosa apresenta um bordo elevado e irregular, com áreas crostosas e drenantes. As úlceras exibem margem elevada e serpiginosa, com um fundo contendo tecido de granulação e exsudato. Placas vegetantes, microabscessos, fístulas e pústulas subcutâneas estão também presentes. O *B. dermatitidis* pode produzir uma importante doença óssea. Vértebras, costelas, crânio e metáfises dos ossos longos são as estruturas ósseas mais frequentemente comprometidas. As manifestações clínicas da forma osteoarticular da blastomicose compreendem dor local, perda funcional, tumefação e eritema de tecidos moles contíguos, abscessos e fístulas, que eliminam material purulento, derrame articular, osteomielites e arterites. Na blastomicose das vias genitourinárias, lesões supuradas podem ser observadas, no homem, em pênis, próstata, vesículas seminais, testículos e bexiga e, na mulher, cérvix, endométrio e trompas. Meningite e abscessos epidurais e cerebrais são as formas clínicas mais comuns na blastomicose do sistema nervoso central. As manifestações clínicas de meningoencefalite se caracterizam por cefaleia, convulsões, estupor, coma e paresias. Uma síndrome de hipertensão intracraneana e sintomas focais são produzidos pelos abscessos cerebrais. Lesões do sistema nervoso central, normalmente, ocorrem em um estágio avançado da infecção pelo *B. dermatitidis*, sendo frequentemente fatais.

Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de blastomicose é feito tanto pela visualização do organismo no tecido ou exsudato quanto pela cultura para isolamento e identificação. Diferentemente de outros agentes fúngicos, a detecção tecidual do *B. dermatitidis* é relativamente fácil e seu isolamento não apresenta maiores complicações.

- **Exame direto e histopatologia:** elementos leveduriformes (8 a15 μm) esféricos com parede celular dupla e refringente, brotamento único e base de inserção larga (4 a 5 μm), entre a célula filha e a célula parental, podem ser visualizados em espécimens clínicos a fresco ou clarificados com KOH a 10%. A coloração pelo calcoflúor pode ser também procedida. As preparações cito e histopatológicas empregadas são Papanicolaou para escarro, Gromori-Grocott (prata) e ácido periódico de Schiff (PAS). Nos cortes histológicos, o *B. dermatitidis* aparece no interior de células gigantes ou livre no tecido supurado. O fenômeno de Splendore-Hoeppli pode ser observado pela hematoxilia e eosina (HE). A distinção tecidual entre *B. dermatitidis* e *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* pode ser feita pela observação da base larga de inserção na gemulação e persistência da união entre a célula-mãe e a gêmula. Ocasionalmente, formas atípicas como hifas septadas e células globosas caternuladas podem ser encontradas no escarro, dificultando o diagnóstico.
- **Cultura:** o isolamento de *B. dermatitidis* de espécimes clínicos pode ser realizado empregando-se ágar infusão de cérebro-coração (BHIA) e ágar de Sabouraud dextrosado, com ou sem antimicrobianos, dependendo se o sítio anatômico é estéril ou naturalmente contaminado, e, ainda, suplementação com sangue. Para amostras muito contaminadas, pode ser empregado o ágar extrato de levedura-fosfato. A incubação deve ser realizada a 28 °C a 30 °C, para a obtenção da fase micelial do fun-

go. O isolamento primário em fase leveduriforme pode ser tentado, mas o meio de cultura não deverá conter cloranfenicol e cicloheximida, pois o *B. dermatitidis* se mostra sensível a esses antimicrobianos à temperatura de 37 °C. O tempo de incubação varia de 14 a 30 dias, mas algumas cepas podem apresentar crescimento em 5 dias. A obtenção da fase micelial, em cultura primária, requer a conversão à fase leveduriforme ou prova do exoantígeno, para confirmação, tendo em vista que essa fase não é típica e morfologicamente é semelhante a espécies do gênero *Chrisosporium*. O dimorfismo pode ser demonstrado pelo cultivo do *B. dermatitidis* em ágar infusão de cérebro-coração (BHIA) a 37 °C.

Blastomyces dermatitidis Gilchrist et Stokes, 1898.

Fase filamentosa:

- **Morfologia macroscópica:** cresce moderadamente em SDA a 30 °C, atingindo 4 a 5 cm em 2 semanas. As colônias são, inicialmente, cerosas ou úmidas (leveduriformes), espiculadas e brancas. Colônias maduras desenvolvem micélio aéreo, dando à superfície um aspecto finamente feltroso ou algodonoso, e tornam-se, com o tempo, beges ou amarronzadas. O reverso é marrom.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são hialinas, septadas, delgadas, medindo 2 µm de diâmetro. Os conídios são unicelulares, hialinos, globosos a subglobosos ou piriformes (em forma de "badalo de sino"). Medem de 2 a 10 µm e se desenvolvem individualmente sobre conidióforos pequenos e simples que se formam perpendicularmente na hifa principal ou diretamente sobre o micélio. Culturas antigas produzem clamidósporos globosos, lisos e de paredes espessas. A conidiação do *B. dermatitidis* não é prontamente diferenciada das de outros fungos, por isso, a conversão à fase leveduriforme é necessária para a confirmação específica.

Fase leveduriforme:

- **Morfologia macroscópica:** a 37 °C, as colônias são brancas ou cremes a beges, com uma superfície elevada, rugosa, com dobras, úmida ou cerosa, glabrosa ou finamente granular.
- **Morfologia microscópica:** as células de levedura são grandes (de 8 a 15 µm, ocasionalmente atingindo 30 µm), de paredes duplas e refringentes, e produzem gemulação simples com base de inserção larga (4 a 5 µm), entre a célula-mãe e a célula-filha. Gemulações contínuas, sem separação dos elementos, podem resultar em cachos ou cadeias de células.

Fase sexual: *Ajellomyces dermatitidis.*

- **Métodos não culturais:** provas sorológicas podem ser utilizadas para demonstrar a presença de anticorpos circulantes para o *B. dermatitidis*, no entanto, são de emprego limitado, devido à pobre sensibilidade e especificidade e a ocorrência de reações cruzadas com *Coccidioides immitis/Coccidioides posadasii, Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Por isso, essas provas têm sido usadas mais como ferramentas de investigação epidemiológica do que como métodos de diagnóstico. Fixação de complemento, imunodifusão dupla, testes cutâneos com blastomicina e ensaio imunoenzimático são as provas disponíveis. Além disso, radioimunoensaio e imunofluorescência indireta também têm sido utilizados no sorodiagnóstico de blastomicose. Os achados radiográficos de blastomicose pulmonar são muito variados, dependentes da fase e do tipo de infecção e inespecíficos. No entanto, a radiografia pulmonar se mostra alterada em dois terços dos casos, revelando infiltrados alveolares e nodulares, padrão reticulonodular, efusão pleural e, raramente, cavitações. A atomografia computadorizada pode detectar, ainda, anormalidades mediastinais, comprometimento ósseo e presença de abscessos cerebrais na blastomicose extrapulmonar.

Diagnóstico diferencial

As lesões cutâneas devem ser diferenciadas de câncer de pele (carcinoma de célula basal e carcinoma de célula escamosa), micose fungoide, coccidoidomicose, histoplasmose, esporotricose, paracoccidioidomicose, sífilis terciária, tuberculose e leishmaniose. A distinção da blastomicose pulmunar deve ser feita com tuberculose, doenças pulmonares virais, coccidioidomicose, histoplasmose, paracoccididomicose, silicose, sarcoidose e neoplasias. A forma osteoarticular deve ser diferenciada de actinomicose, tuberculose e coccidioidomicose.

Prognóstico e tratamento

O prognóstico é bom, mesmo para as formas progressivas. No entanto, é ruim em pacientes imunocomprometidos. Altas taxas de mortalidade são também observadas na doença pulmonar complicada por insuficiência respiratória. Com relação ao tratamento, há consenso na literatura de que todos os pacientes com blastomicose pulmonar crônica e extrapulmonar devem receber quimioterapia antifúngica. Para a blastomicose pulmonar aguda, alguns autores advogam que nem todas as formas dessa condição devem ser submetidas à terapia com antifúngicos. Todavia, a maioria dos estudos recomenda a intervenção farmacológica. Anfotericina B em sua formulação tradicional ou formulações lipídicas, cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol são as drogas antifúngicas empregadas. Ocasionalmente, podem ser requeridos tratamentos cirúrgicos.

■ CANDIDÍASE

Etiologia e epidemiologia

A infecção causada por *Candida* sp. é denominada, genericamente, candidíase. O principal agente etiológico é a *Candida albicans,* que é um comensal do trato gastrintestinal e geniturinário dos seres humanos. Espécies não *albicans*, como *Candida auris* (multirresistente), *Candida dubliniensis*,

*Candida glabrata lato sensu, Candida guilliermondii, Candida kefyr, Candida krusei, Candida lusitaniae, Candida norvegensis, Candida parapsilosis lato sensu, Candida rugosa*e *Candida tropicalis,* têm sido, contudo, cada vez mais isoladas de casos de doença humana. Nos tecidos, *Candida* sp. pode ser visualizada como células ovaladas com blastósporos e produção de pseudohifas e hifas verdadeiras. Como a morfologia tecidual ou em cultura é de emprego limitado na identificação dos agentes, o diagnóstico laboratorial é feito, fundamentalmente, por testes de assimilação de carbohidratos e nitrato. Importa mencionar que, com os estudos de biologia molecular, a taxonomia das espécies de *Candida* vem apresentando algumas alterações. Particularmente em *C. glabrata (lato sensu)* e *C. parapsilosis (lato sensu)*, evoluiu-se para o entendimento de que essas leveduras constituem, na verdade, um complexo de espécies. Desse modo, o complexo *C. glabrata* seria composto por *Candida glabrata sensu stricto*, *Candida bracarensis* e *Candida nivariensis* e o complexo *C. parapsilosis* seria formado por *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*.

A *Candida* spp. é amplamente difundida na natureza, sendo encontrada em associação com diferentes seres vivos. No hospedeiro humano, essas leveduras podem ser recuperadas de mucosa oral, em 31% a 55% dos indivíduos normais, e de mucosa do trato genital feminino, em 10% a 20% de mulheres assintomáticas em idade reprodutiva. As espécies mais isoladas do trato digestivo são *C. albicans* (70% a 80%), *C. glabrata lato sensu* e *C. tropicalis* (5% a 8%) e, de vulvovaginites, *C. albicans* (90% a 95%) e *C. glabrata lato sensu* (10% a 15%). Em candidíases do trato urinário, a maior incidência é também de *C. albicans* (52%), seguida por *C. glabrata lato sensu* (16%).

Dentro das candidíases invasivas, 76% dos isolados são *C. albicans*, 7% são *C. tropicalis*, 2,5% são *C. parapsilosis lato sensu* e 1% são *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C kefyr*. Em termos de distribuição nosocomial, *Candida* spp. é o sexto agente mais encontrado no conjunto das unidades hospitalares (7,8%) e o quarto mais frequentemente isolado de infecções da corrente sanguinea (10,2%), em unidades de tratamento intensivo (UTI). Altas taxas de mortalidade bruta (60%) e atribuível (40%), bem como resistência a antifúngicos de uso sistêmico têm sido também associadas às formas invasivas de candidíase. A emergência dessas infecções e a ocorrência de surtos como, recentemente, os de *Candida auris*, uma levedura considerada multirresistente, tendo em vista apresentar, em conjunto, baixa sensibilidade às três principais classes de antifúngicos de uso clínico (azoles, polienos e candinas) e grande capacidade de disseminação e permanência nos ambientes médicos, em decorrência do contato com superfícies, equipamentos e pessoas contaminadas, reitera e expõe a importância epidemiológica e em saúde pública da doença invasiva por *Candida* spp.

As manifestações clínicas das candidíases são extremamente variadas e qualquer órgão ou tecido do organismo pode ser afetado. Essas infecções têm forte natureza oportunista e podem ser adquiridas de maneira endógena (endomicoses), a partir da *Candida* sp. colonizante, ou exógena, pela veiculação de microrganismos pelas mãos dos profissionais de saúde e produtos biológicos, equipamentos e dispositivos contaminados.

Clínica e patologia

As candidíases são um conjunto de infecções que podem ser classificadas em superficiais (cutâneo-mucosas) e profundas (invasivas). As formas cutâneo-mucosas compreendem as candidíases cutâneas, onicomicoses e queratomicoses, candidíases orofaringeanas, candidíase mucocutânea crônica e vulvovaginites. As candidíases invasivas incluem as candidemias, as candidíases disseminadas agudas e crônicas e aquelas localizadas em um único órgão. Membros do gênero *Candida* são parte integrante da microbiota e sua patogenicidade resulta, essencialmente, das alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro humano. Os principais componentes envolvidos na patogênese das candidíases são a quebra da barreira tegumetar, o aumento da colonização fúngica e o comprometimento do sistema imunológico.

A candidíase cutânea acomete, normalmente, as áreas intertriginosas da pele, como axilas, região genital e inguinal, área perianal e interglúteos e outras dobras do corpo, produzindo lesões exudativas e eritematosas de bordos escamosos e irregulares, com pequenas vesículas e pústulas satélites, que se rompem formando uma superfície erodida. Prurido e sensação de queimação estão presentes. Menos frequentemente, lesões papulopustulares e foliculares são observadas. Espaços interdigitais podem apresentar lesões fissuradas com espessamento esbranquiçado da pele e dor. Esse tipo de lesão é também denominado *erosio interdigitalis blastomycetica*. Diabetes melito, obesidade, alcoolismo, maceração e elevados níveis de umidade são fatores que podem determinar a ocorrência das afecções intertriginosas. Lesões macronodulares cutâneas podem ser decorrentes de candidíase disseminada aguda com envolvimento renal. A candidíase pelo uso de fralda em lactantes afeta, inicialmente, a região inguinal, suprapúbica e glútea. As lesões se apresentam exudativas e eritematosas, com pústulas e vesículas e bordos com rachaduras. Essas lesões são comumente relacionadas à má utilização de fraldas, produzindo uma dermatite irritativa que pode ser invadida por *Candida* sp. proveniente de fezes. A candidíase nodular granulomatosa da fralda tem sido também descrita nessa mesma faixa etária infantil. Outros processos cutâneos menos comuns são a candidíase cutânea generalizada e a candidíase cutânea congênita.

Unhas e região periungueal são afetadas com frequência por essa levedura. A umidade constante das mãos predispõe à infecção. Duas formas clínicas principais podem ser consideradas, a paroníquia e a onicomicose. Na paroníquia, a região periungueal se apresenta inflamada, avermelhada, afastada da lâmina ungueal, com sensibilidade dolorosa e produção de pus. Em sua forma crônica, a lâmina ungueal é comprometida. Normalmente, a onicomicose tem início no bordo proximal ou margem lateral da unha e se caracteriza pela presença de manchas brancas, amareladas, esverdeadas ou negras que se espalham por toda a lâmina ungueal. A unha se apresenta destacada de seu leito, espessada e endurecida com sulcos e estrias, mas não friável. *Candida albicans* e *C. parapsilosislato sensu* são as espécies mais isoladas.

As candidíases orofaringeanas são frequentes em pacientes com disfunções de células T, como aquelas observadas nos linfomas e na Aids. Esses processos podem ser facilitados também por regimes de quimioterapia e radioterapia, que levam à ocorrência de mucosites e destruição de mucosa. O uso prolongado de antibióticos contribui, igualmente, para o sobrecrescimento de *Candida* sp. *Candida albicans* é a espécie responsável pela maioria dos casos de candidíase oral e o principal sintoma é a formação de membranas de coloração branca (*thrust*). Dor, sensação de queimação e disfagia podem estar presentes. As formas de candidíase orofaringena são classificadas em candidíase pseudomembranosa aguda, candidíase atrófica aguda, candidíase atrófica crônica, candidíase hiperplásica crônica e queilite angular. A candidíase pseudomembranosa aguda se apresenta como placas esbranquiçadas pequenas ou confluentes na mucosa gengival, no palato e língua, com superfície eritematosa e hemorrágica, facilmente destacáveis. As lesões iniciais podem se espalhar e acometer comissura labial, faringe, esófago e traqueia, dificultando a deglutição e a respiração. A candidíase atrófica crônica está associada ao uso de dentadura e apresenta, como sinais, eritema, edema e erosão da região da mucosa do palato em contato com a prótese. Com frequência, a queilite angular está presente.

A candidíase atrófica aguda ocorre, normalmente, pela administração prolongada de antibióticos de largo espectro e se caracteriza pelo surgimento de lesões eritematosas e erodidas na mucosa oral e no dorso da língua. A intolerância aos alimentos e bebidas e a sensação de dor são típicas dessa condição. A candidíase hiperplásica crônica (leucoplasia oral) é constituída por placas translúcidas brancas ou opacas densas e aderidas, associadas a lesões de natureza maligna ou pré-maligna na mucosa da boca. Fatores predisponentes, como fumo e traumatismo têm sido descritos. A queilite angular se caracteriza pela presença de lesões esbranquiçadas, eritematosas e rachaduras na comissura labial. Outro processo relacionado à candidíase orofaringeana e à antibioticoterapia prolongada é a língua vilosa negra, que se caracteriza por lesões hipertróficas enegrecidas das papilas do dorso da língua.

Depois da orofaringe, o esôfago é a região do trato gastrintestinal mais acometida por infecções por *Candida* spp. A prevalência de candidíases esofagianas teve um considerável aumento devido à pandemia da Aids e, mais recentemente, esse aumento é decorrente do número crescente de pacientes transplantados, apresentando neoplasias ou gravemente imunocomprometidos. Normalmente, a esofagite por *Candida* sp. cursa com disfagia, odinofagia e dor retroesternal. Em alguns casos, dor epigástrica é o sintoma dominante. Na grande maioria das vezes, a candidíase esofagiana ocorre de maneira independente no terço distal do esôfago, sendo raramente uma extensão da infecção da orofaringe. A candidíase de laringe, ao contrário das infecções orais e esofagianas, são pouco frequentes e os sintomas associados a essa condição são estridor, odinofagia e disfagia.

A candidíase mucocutânea crônica é uma síndrome que afeta múltiplos sítios superficiais, como mucosa oral, pele e unhas, e é decorrente de falhas nos mecanismos de defesa dos hospedeiros contra *Candida* spp., por alterações genéticas e endócrinas. Disgenesia tímica, disfunções poliendócrinas, resposta sorológica defeituosa ou fatores idiopáticos estão fortemente relacionados a essa entidade clínica. Normalmente, a infecção é resistente à quimioterapia antifúngica e acomete crianças entre o primeiro e o nono ano de vida, mas uma forma adulta tem sido também relatada. Placas membranosas esbranquiçadas na mucosa oral e lesões na comissura labial, frequentemente, são o início do processo. Um comprometimento do esôfago e da laringe pode estar presente. Lesões elevadas, hiperqueratóticas, granulomatosas e vegetantes, que comprometem a pele do couro cabeludo, face, tronco e membros, mãos e pés, além de paroníquia e invasão da lâmina ungueal com descoloração, intensa distrofia e formação de crostas são comumente observadas. Uma condição de ocorrência pouco frequente e de caráter terminal é o granuloma por *Candida* spp. Clínicamente, as lesões se apresentam como pápulas vascularizadas, cobertas por crostas de coloração amarelada, aderentes e extremamente protuberantes, que se localizam no couro cabeludo, face, tronco, membros e unhas. Falhas imunológicas de etiologia variada predispõem a essa patologia.

Vulvovaginites podem ocorrer pelo aumento da colonização e invasão da mucosa por *Candida* spp., devido a fatores relacionados à virulência do próprio patógeno, ao hospedeiro (diabetes melito, níveis de estrogênio, reservatório intestinal, transmissão sexual, redução da resistência local ou sistêmica, antibioticoterapia e imunossupressão) e à exposição ambiental. Clinicamente, o prurido vulvar é o aspecto mais aparente. A descarga vaginal amarelada de consistência fluida a espessa pode ser mínima ou ausente. Todavia, sensibilidade, irritação, queimação, dispareunia e disúria são extremamente comuns. Com frequência, são descritas placas membranosas de aspecto esbranquiçado, edema, eritema e fissuras na mucosa vaginal e vulvar. Lesões vesículo-pustulares, ulceradas, inflamadas e pruriginosas podem se estender ao períneo e à região inguinal. A cronicidade ou recorrência dessas lesões são relatos frequentes. Balanites ou balanopostites por *Candida* spp. se caracterizam por apresentar placas esbranquiçadas, pústulas, eritema e erosões da mucosa da glande e prepúcio. Prurído e sensação de ardência podem ser observados no pênis e na região crural. Normalmente, a infecção em órgãos genitais masculinos está associada a uma candidíase vaginal.

A candidíase do trato urinário é um achado relativamente raro em indivíduos normais. Todavia, a incidência de candidúria tem aumentado dramaticamente entre os pacientes hospitalizados. A recuperação de *Candida* spp. de amostras de urina apresenta-se como um dilema, já que a ocorrência dessa levedura pode significar apenas colonização ou contaminação, não necessitando de tratamento. No entanto, pode significar também infecção do trato urinário inferior ou superior, o que requer intervenção. As estratégias para o manejo de pacientes com candidúria devem ser baseadas na presença de outros fatores, como anormalidades anatomoclínicas do trato geniturinário (obstrução do fluxo urinário, tuberculo-

se), diabetes, transplante renal e febre. Além disso, também devem ser considerados antibioticoterapia, imunossupressores, radioterapia, sondas urinárias, cateteres endovenosos, sexo e senilidade. A infecção ascendente é a principal rota da candidíase do trato urinário, ocorrendo de forma mais prevalente em pacientes do sexo feminino. A cateterização também pode permitir a entrada de *Candida* spp. colonizante ou exógena. Em pacientes hospitalizados, que apresentam cateteres, a candidúria assintomática é uma condição frequente. Processos sintomáticos do trato urinário inferior, apesar de menos comum, podem cursar clinicamente com irritação vesical, disúria, hematúria e sensibilidade suprapúbica. Pacientes com infecção do trato urinário superior podem apresentar pielonefrites ascendentes e urosepse. Febre, dor costovertebral e leucocitose estão normalmente presentes. A infecção ascendente quase sempre ocorre devido à obstrução urinária e estase, especialmente em pacientes com diabetes ou nefrolitíase. A pielonefrite por *Candida* sp. pode complicar em decorrência de doença supurativa local, levando à pielonefrose e à formação de abscessos. A principal complicação, contudo, é a bola fúngica ureteropélvica, que produz **a** obstrução do ureter ou da pelve. A infecção primária dos rins ou aquela secundária à candidíase hematogênica apresenta febre elevada, instabilidade hemodinâmica e variado quadro de insuficiência renal. Hemoculturas positivas e a ocorrência de infecções oculares e lesões macronodulares cutâneas podem sugerir candidíase disseminada com manifestação renal.

As candidíases disseminadas são, usualmente, definidas como infecções por *Candida* spp. em dois ou mais órgãos não contíguos. O grupo de risco compreende recém-nascidos, pacientes cirúrgicos, pacientes com queimaduras de segundo e terceiro graus, pacientes diabéticos, pacientes com câncer, pacientes submetidos a transplantes, pacientes com neutropenia grave e pacientes com acesso vascular. A infecção hematogênica pode acometer, virtualmente, qualquer sítio anatômico, produzindo, por isso, diferentes quadros mórbidos. Endoftalmites hematogênicas com comprometimento de retina, pneumonia como resultado de aspiração ou disseminação na corrente sanguínea, infecções renais graves com necrose papilar e abscessos corticais, peritonites causadas por cirurgia abdominal, perfuração intestinal ou cateter de diálise, bem como meningoencefalites, endocardites, hepatites, pancreatites, osteomielites e artrites sépticas têm sido descritas na candidíase disseminada. O espectro das candidíases disseminadas inclui tanto uma apresentação aguda quanto crônica.

A candidíase aguda é de ocorrência súbita e progressiva, e caracterizada por fungemia, febre persistente ou recorrente, a despeito de antibioticoterapia, lesões tegumentares, infecção de múltiplos órgãos, particularmente em rins, cérebro, coração e olhos e choque séptico. Pacientes neutropênicos com leucemia ou linfomas compõem um importante grupo de risco. Normalmente, essa condição surge como uma complicação da terapia antineoplásica. Altas taxas de mortalidade têm sido relatadas pelo fato das hemoculturas serem, usualmente, negativas para *Candida* spp., o que dificulta o estabelecimento do diagnóstico e produz atrasos no tratamento. Assim, o envolvimento ocular e cutâneo, por estar bem caraterizado na candidíase disseminada aguda, é um importante parâmetro clínico.

Por sua vez, a candidíase disseminada crônica ou hepatoesplênica é de curso lento, estendendo-se por muitos meses. Tipicamente, o paciente apresenta uma enfermidade hematológica de base e adquire a infecção, após a quimioterapia mielossupressora. A candidíase disseminada crônica tem sido referida como candidíase hepatoesplênica, pelo fato de as lesões primárias serem encontradas no baço e no fígado; todavia, os aspectos clinicopatológicos desse processo claramente indicam que a infecção envolve diversos órgãos. Abscessos profundos no fígado, baço, rins e pulmões têm sido descritos. Diferentemente da candidíase aguda, a associação com fungemias, falências múltiplas de órgãos e hipotensão são menos frequentes na doença crônica. A candidíase crônica é estabelecida durante o período em que o paciente está neutropênico e torna-se clinicamente percebida na fase de reconstituição imunológica. O paciente continua apresentando febre persistente não responsiva à antibioticoterapia e desconforto abdominal, mesmo com contagens aumentadas de neutrófilos. As lesões em órgãos internos estão radiologicamente ocultas na fase neutropênica, mas passam a ser evidentes nos métodos de investigação por imagem, após a neutropenia. O isolamento de *Candida* sp. de material de biópsia ou sítios estéreis confirma o processo infeccioso. Essa condição é quase sempre limitada a pacientes que se tornaram neutropênicos devido à quimioterapia citotóxica, ocorrendo muito raramente em pacientes cirúrgicos não neutropênicos.

Dentre as infecções fúngicas nosocomiais, as candidemias são preponderantes. Candidemias são definidas como o isolamento de *Candida* spp. de pelo menos uma hemocultura, cujos espécimens de sangue foram obtidos de pacientes com sinais clínicos de sepse e sem evidência de comprometimento de órgãos internos. Altas taxas de mortalidade bruta (> 50%) e atribuída (38%) têm sido descritas para essas infecções. Candidemias progressivas, que se desenvolvem durante a terapia antifúngica sistêmica, podem apresentar percentuais de mortalidade de quase 80%. Os pacientes de risco são aqueles submetidos à antibioticoterapia, terapia com imunossupressores, quimioterapia, radioterapia, dispositivos de acesso, cirurgias extensas e transplantes e longos períodos de internação. O papel do trato gastrintestinal, dos cateteres vasculares e dispositivos médicos diversos, superfícies e pessoas como fontes de infecção hospitalar está bem estabelecido para esses pacientes.

Processos alérgicos dérmicos, ocasionados pelos metabólitos extracelulares de *Candida* spp., têm sido também descritos. Clinicamente, essas reações de hipersensibilidade são conhecidas como candídides e se caracterizam por apresentar lesões vesiculares assépticas nos espaços interdigitais das mãos e outras regiões do corpo. Esses processos são semelhantes às dermatofitides, tanto em sua patogenia quanto em seus aspectos clínicos. Além disso, exatamente como nas reações alérgicas determinadas pelos dermatófitos, as candídides resolvem com a cura da infecção por *Candida* spp. Outras síndromes cutâneas de natureza alérgica, causadas por essa levedura, são

urticária e eczema, asma, gastrite e uveítes semelhantes àquelas produzidas em histoplasmose.

Diagnóstico laboratorial

- **Exame microscópico direto e histopatologia:** a visualização microscópica dos elementos fúngicos teciduais, como células de levedura, blastósporos, pseudohifas e hifas verdadeiras é importante para a caracterização da infecção por *Candida* spp. A presença de micélio verdadeiro em espécimens recentes sugere um estado invasivo da levedura, o que permite a separação com as *Candida* spp. contaminantes. As lesões cutâneas, mucosas e secreções podem ser observadas em montagens microscópicas em salina, KOH 20% a 40% ou Gram. Giensa ou Wright podem ser empregados para a demonstração do fungo em amostras de sangue. A urinálise pode ser inconlusiva, já que a presença de *Candida* spp. pode representar contaminação, colonização ou infecção. Entretanto, contagens de colônias superiores a 10^4 ufc/mL, em ausência de cateter urinário, pode denotar processo infeccioso. Além disso, a piuria observada pode não estar associada à infecção por *Candida* spp. e ser decorrente de injúrias produzidas pelo cateter urinário e/ou ser resultado de bacteriuria concomitante. Para a evidenciação da invasão tecidual por *Candida* spp., podem ser utilizados hematoxilina e eosina (HE) ou Gram e/ou colorações histopatológicas mais efetivas como ácido periódico de Schiff (PAS), Gromori-Grocott (prata) ou Gridley. Estruturas leveduriformes arredondadas, blastósporos ou gêmulas, clamidósporos, pseudohifas e micélio verdadeiro, bem como células epiteliais, polimorfonucleares, linfócitos, granulomas, microabscessos e material necrótico podem ser detectados no exame histológico das lesões. No paciente imunocomprometido, contudo, a reação celular pode ser mínima.
- **Cultura e provas bioquímicas:** o isolamento primário de *Candida* spp. pode ser realizado utilizando-se ágar de Sabouraud dextrosado (SDA) ou ágar de Sabouraud dextrosado, acrescido de cloranfenicol ou cloranfenicol e cicloheximida (Mycosel), quando as amostras clínicas forem obtidas de sítios não estéreis. *Candida glabrata lato sensu, C. krusei, C. parapsilosis lato sensu* e *C. tropicalis* podem ser, todavia, sensíveis à cicloheximida. Mesmo apresentando baixa sensibilidade (< 50%), as hemoculturas são importantes fontes para o isolamento de *Candida* spp. de processos invasivos. Sistemas manuais ou automatizados como ágar infusão de cérebro-coração bifásico (BHIA-bifásico) ou lise-centrifugação podem ser empregados. A incubação das culturas pode ser procedida à temperatura de 25 °C a 30 °C ou à temperatura de 37 °C. Após 24 a 72 horas, uma colônia esbranquiçada, pastosa e de aspecto cerebriforme a rugoso pode estar presente. A estrutura micromorfológica é constituída por células de levedura ovaladas, blastósporos e pseudohifas semelhantes àqueles elementos observados nos tecidos. A identificação das espécies de *Candida* pode ser feita a partir de provas morfológicas e provas bioquímicas e diferenciais (Quadro 63.1). A *Candida albicans* pode ser identificada pela produção de tubo germinativo em soro sanguíneo animal ou humano ou água peptonada, à temperatura de 37 °C, por até 3 horas (o ideal são 2 horas), e/ou pela produção de clamidósporos, em ágar milho com tween 80, à temperatura de 30 °C, por 24 a 48 horas. Resultados negativos nessas provas conduzem à identificação bioquímica e enzimática dos isolados clínicos. Essas provas bioquímicas estão baseadas na assimilação e fermentação de carboidratos e assimilação nitrato. Comercialmente, estão disponíveis métodos manuais e sistemas automatizados ou semiautomatizados. Dentre esses, podem ser utilizados o Auxacolor (Bio-Rad), API 20C AUX (bioMérieux), Sistema VITEK (bioMérieux) e MicroScan (Dade Behring). O isolamento e a identificação de *Candida* spp. pode ser também procedido por meio de meios cromogênicos. A detecção de atividade enzimática, a partir da hidrólise de substratos que produzem cor em presença de um indicador, é o fundamento dessas provas. O CHROMagar–*Candida* (bioMérieux), que permite a identificação de espécies de interesse médico, como *C. albicans* (verde), *C. glabrata lato sensu* (violeta), *C. krusei* (rosa/rugosa) *e C. tropicalis* (azul petróleo) é um dos sistemas mais difundidos. Outros sistemas enzimáticos podem utilizar substratos fluorogênicos, como o Bacti-Card *Candida*. A descrição de alguns agentes é feita a seguir.

Candida albicans (Robin) BerKhout, 1923.

- **Morfologia macroscópica:** cresce rapidamente, alcançando a maturidade em três dias. As colônias são brancas a creme, lisas, macias, cerosas, brilhantes e pastosas, tornando-se rugosas.
- **Morfologia microscópica:** em ágar cornmeal - tween 80, a 30 °C, as colônias são compostas por pequenas células globosas (5 a 7 μm), ovais a alongadas (6 a 4 × 6 a 10 μm). Alguns isolados, frequentemente, produzem células globosas grandes com pequenos e uniformes brotos multipolares. As células de levedura podem sofrer três processos morfológicos diferentes: formação de blastósporos (brotos ou gêmulas), formação de pseudohifas e hifas e formação de tubo germinativo. Os fatores que favorecem a formação dessas estruturas estão relacionados ao pH, à composição química do meio, ao tamanho do inóculo e à temperatura de incubação. A 30 °C, pseudomicélio e micélio verdadeiros são formados. Massas ou cachos de blastósporos (4 μm) são formados lateralmente nos pontos de constrição das pseudohifas. Clamidósporos (8 a 12 μm) arredondados, de paredes espessas e em pares são formados na extremidade das pseudohifas ou hifas ou, ainda, isoladamente em células de suporte, ao longo do pseudomicélio. A formação de clamidósporos é

Quadro 63.1 Provas fisiológicas de espécies de *Candida* e *Saccharomyces* de interesse médico.

Espécies	Auxanograma												Zimograma						Outras reações				
	Dextrose	Maltose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melibiosa	Celobiose	Inositol	Xilose	Rafinose	Trealose	Dulcitol	Dextrose	Maltose	Sacarose	Lactose	Galactose	Trehalose	Urease	NO3K	Pseudohifas	Crescimento a 37 °C	Tubos germinativos
Candida albicans	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	F	F	-	-	F	F	-	-	+	+	+
Candida famata	+	+	+	+*	+	+*	+	-	+	+	+	+*	F	-	F	-	-	F	-	-	-	+	-
Candida glabrata (lato sensu)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	F	-	-	-	-	F	-	-	+	+	-
Candida guilliermondii	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	F	-	F	-	F	F	-	-	+	+	-
Candida inconspicua	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Candida kefyr	+	-	+	+	+	-	+	-	+*	+	-	-	F	-	F	F	F	F	-	-	+	+	-
Candida krusei	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	+*	-	+	+	-
Candida lipolytica	+	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-**	-	-
Candida parapsilosis (lato sensu)	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	F	-	-	-	F	F	-	-	+	+	-
Candida rugosa	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
*Candida stellatoidea***	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+*	-	F	F	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Candida tropicalis	+	+	+*	-	+	-	+*	-	+	-	+	-	F	F	F*	-	F	F	-	-	+	+	-
Saccharomyces cerevisiae	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+*	-	F	F	F	-	F	F*	-	-	+	+	+

Legenda: * variação de cepa; + positivo/assimilacão; - negativo; F produção de ácido e gás.

** *Candida lipolytica* diferenciada de *Candida krusei* pela presença de hifas e pseudohifas.

*** Considerada como *Candida albicans* quando se identifica *Candida stellatoidea.*

inibida a 37 °C. Em soro sanguíneo, água peptonada ou albumina de ovo, a 37 °C, por 2 a 3 horas, tubos germinativos são formados a partir dos blastósporos. Isolados que receberam extensiva terapia antifúngica podem apresentar perda de filamentação e fermentar fracamente os açúcares, confundindo o diagnóstico.

Candida glabrata (Anderson) Meyer et Yarrow, 1917.

- **Morfologia macroscópica:** cresce rapidamente, alcançando a maturidade em três dias. As colônias são creme, macias, lisas, lustrosas e úmidas.
- **Morfologia microscópica:** em ágar cornmeal - tween 80, a 30 °C, são produzidas somente pequenas células globosas a ovais (2 a 3 × 4 a 5 μm), com simples gemulações terminais. Não há formação de pseudomicélio. Modernamente, por avaliações moleculares, *C. glabrata* (*lato sensu*) é considerada um complexo de espécies formado por *Candida glabrata sensu stricto*, *Candida bracarensis* e *Candida nivariensis*.

Candida guilliermondii (Castellanii) Langeron et Guerra, 1938.

- **Morfologia macroscópica:** cresce rapidamente, atingindo a maturidade em três dias. As colônias são delgadas, lisas, macias, cerosas, brilhantes, com margens bem definidas e de coloração branca a creme, tornando-se amarelas a rosadas e rugosas.
- **Morfologia microscópica:** em ágar cornmeal - tween 80, a 30 °C, as células são pequenas ovais a alongadas (1,5 a 4,8 × 2 a 15 μm), as pseudohifas são poucas e pequenas, bem ramificadas, e dão origem a cachos de blastósporos nos pontos de constrição, mas hifas verdadeiras não são produzidas.

Candida krusei (Castellani) Ber Khout, 1923.

- **Morfologia macroscópica:** cresce rapidamente, alcançando a maturidade em três dias. As colônias são creme, lisas, secas e com franjas miceliais.
- **Morfologia microscópica:** em ágar cornmeal - tween 80, a 30 °C, as células são ovoides, alongadas ou cilíndricas, medindo 2,6 a 5,6 × 4 a 15 μm. Pseudohifas com cachos de blastósporos são produzidas. Os blastósporos são alongados, criando uma aparência de "palito de fósforo" ou de "árvore".

Candida parapsilosis (Ashford) Langeron et Talice, 1932.

- **Morfologia macroscópica:** cresce rapidamente, alcançando a maturidade em três dias. As colônias são brancas, macias, lisas e polidas, algumas vezes rendilhadas, passando a creme amareladas e rugosas.
- **Morfolgia microscópica:** em ágar cornmeal - tween 80, a 30 °C, as células são ovais, elípticas e alongadas (4,3 × 3 a 9 μm). As pseudohifas são delgadas, curtas, alongadas, curvadas e ramificadas. Ocasionalmente, estão presentes grandes elementos celulares, chamados de células gigantes. Os blastósporos são ovoides a alongados e estão isolados ou em cachos, próximos dos pontos de constrição das pseudohifas. Por estudo moleculares, atualmente, *C. parapsilosis* (*lato sensu*) é considerada um complexo constituído por três espécies: *Candida parapsilosissensu stricto* (Grupo I), *Candida orthopsilosis* (Grupo II) e *Candida metapsilosis* (Grupo III).

Candida tropicalis (Castellani) Berkout, 1923.

- **Morfologia macroscópica:** cresce rapidamente, alcançando a maturidade em três dias. As colônias são brancas a creme, macias, lisas e brilhantes, passando a reticuladas ou rugosas e, frequentemente, com um crescimento micelial.
- **Morfologia microscópica:** em ágar cornmeal - tween 80, a 30 °C, as células são globosas, ovoides a alongadas, medindo de 4 a 7 × 5 a 11 μm. As pseudohifas são longas e ramificadas, originando blastósporos simples ou em cadeias e cachos nos pontos de constrição. Hifas verdadeiras podem ser produzidas. Alguns isolados produzem clamidósporos, especialmente em isolamento inicial, globosos ou piriformes, na extremidade de pseudohifas ou hifas, mas não são regularmente produzidos. A *C. tropicalis* pode produzir tubo germinativo no soro, a 37 °C, por 2 a 3 horas, todavia, clamidósporos e tubos germinativos não são consistentes, sendo perdidos em subcultivos. Os clamidósporos diferem daqueles *da C. albicans* por não apresentarem células que os suportam. O tubo germinativo, ao contrário do da *C. albicans*, apresenta um estreitamento ou constrição no ponto de inserção com a célula de levedura.

- **Métodos não culturais:** a documentação de uma infecção invasiva por *Candida* spp. é obtida por meio de cultura positiva de sangue, cultura positiva de órgãos, cavidades e fluidos corporais estéreis e evidência clínico-radiológica de doença disseminada. O estabelecimento de um diagnóstico efetivo é dificultado pelo fato de as manifestações clínicas de infecção invasiva serem pouco específicas, os procedimentos microbiológicos serem negativos ou demonstrarem tardiamente a presença do agente causal e as técnicas de biópsia serem comumente inacessíveis.

Com o problema das falhas no diagnóstico das candidíases invasivas pelas técnicas micológicas convencionais, a contribuição de técnicas não culturais tem sido avaliada. Muitas delas, entretanto, apresentam resultados discrepantes e de difícil interpretação. A baixa sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos com anticorpos para *Candida* spp. tem restringido a utilização dessas provas no imunodiagnóstico das infecções profundas. A detecção de uma resposta humoral em pacientes com candidíase invasiva é de emprego limitado, principalmente porque a colonização por *Candida* spp. do trato digestivo ou de outros sítios anatômicos determina a produção de anticorpos em indivíduos sem infecção. Além disso, pacientes imunocomprometidos podem não apresentar quantidades detectáveis de anticorpos, apesar de demonstrarem a ocorrência de infecção por espécies de *Candida*.

Diferentemente das provas com anticorpo, a detecção de antígenos circulantes de *Candida* spp. tem mostrado potencial para o diagnóstico precoce. A enolase (proteína citoplasmática 48-kDa) tem sido empregada como um marcador para o diagnóstico de candidíase invasiva, pois está presente em pacientes com candidemia e não tem sido detectada em colonização por *Candida* spp. ou em indivíduos sem evidência de infecção. A b-(1-3)-D-glucana circulante também tem sido demonstrada em pacientes com candidíase, todavia, resultados positivos não indicam, claramente, qual o agente fúngico envolvido. As mananas séricas são igualmente marcadores antigênicos que podem ser utilizados para o diagnóstico de infecção sistêmica. Correlações positivas entre mananas de *Candida* spp. circulantes e invasão tecidual têm sido observadas. O fato desses marcadores estarem pouco relacionados à candidemias transientes ou àquelas dependentes de cateter venoso central falam favoravelmente com relação à sua utilização em provas imunológicas.

O uso do D-arabinol como outro marcador diagnóstico para as candidíases invasivas tem sido também proposto. *Candida albicans* produz grandes quantidades desse álcool em cultura e em tecido animal e humano com infecção invasiva. Altas concentrações de arabinol no soro são detectadas em pacientes com infecção, mas não naqueles com colonização. Contudo, a determinação das espécies de *Candida* produtoras de arabinol *in vivo* e a padronização das metodologias de detecção condicionam a efetiva utilização desse marcador.

Tendo em vista as altas taxas de detecção e a acurada capacidade de identificação das espécies de *Candida* nas amostras clínicas, as técnicas de Biologia Molecular converteram-se em promissores instrumentos de diagnóstico de laboratório das candidíases invasivas. Além da elevada sensibilidade e especificidade, essas metodologias de detecção de DNA fúngico, como o PCR e suas variações, têm demonstrado boa correlação com a evolução clínica e os valores preditivos negativos em torno de 98% para candidíases disseminadas em pacientes neutropênicos.

Diagnóstico diferencial

Candida spp. podem produzir infecções endógenas e exógenas, acometendo, de maneira oportunista e inespecífica, qualquer órgão e sistema. Por isso, o isolamento dessa levedura deve vir acompanhado de uma avaliação criteriosa do contexto clínico do paciente. Manifestações de doença, detecção dos elementos fúngicos teciduais e fatores de risco compõem os principais parâmetros a serem analisados para a definição do significado clínico de um isolado.

Prognóstico e tratamento

O prognóstico das candidíases é dependente de sua forma clínica e das patologias de base. A melhora da condição clínica dos processos primários tem reflexo direto na evolução das infecções por *Candida* sp. Derivados azólicos de uso tópico (econazol, clotrimazol, isoconazol, miconazol, tioconazol) e sistêmicos (itraconazol, fluconazol, posaconazol, ravuconazol e voriconazol), clioquinol, tolciclato, terbinafina, ciclopiroxolamina, amorolfina, candinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) nistatina e anfotericina B (tradicional ou formulações lipídicas) e 5-fluorocitosina associada à anfotericina B são empregados na quimioterapia de candidíases superficiais e profundas. Particularmente, para as candidíases invasivas, em pacientes críticos, a terapia de reconstituição imunológica e os protocolos de tratamentos antifúngicos profiláticos e empíricos têm sido desenvolvidos. Cirurgias podem ser requeridas.

COCCIDIOIDOMICOSE

Etiologia e epidemiologia

A coccidioidomicose é uma infecção sistêmica de natureza benigna e assintomática e de rápida resolução. Acomete, inicialmente, os pulmões, porém pode evoluir a um processo progressivo e generalizado. Os agentes etiológicos dessa micose são os fungos dimórficos *Coccidioides immitis* (América do Norte) e *Coccidioides posadasii* (América do Sul e Brasil), ambos indistinguíveis morfologicamente. Na natureza, o *C. immitis/C. posadasii* apresentam uma morfologia filamentosa com hifas septadas hialinas e ramificadas e produção de artrósporos. A morfologia tecidual é constituída por esférulas grandes (20 a 89 μm) com paredes espessas e refringentes e contorno duplo, contendo, em seu interior, numerosos endósporos (2 a 5 μm) arredondados ou poliédricos. Esses fungos são encontrados em solos arenosos, alcalinos, ricos em sais e com vegetação pobre de regiões semiáridas ou desérticas. As áreas endêmicas compreendem o sudoeste dos Estados Unidos (Sonora Inferior) e determinadas regiões da América Central, como México, Guatemala, El Salvador e Honduras, e América do Sul, como Venezuela, Colômbia, Bolívia, Paraguai, Argentina e Brasil (Polígono das Secas). Tipicamente, essas áreas se caracterizam por uma estação de chuvas e temperaturas mais amenas, onde o crescimento micelial do fungo é favorecido, e uma longa fase de intenso calor e estiagem, que estimula a artrosporulação e a disseminação do fungo no ambiente. As infecções ocorrem, principalmente, no período de verão, após invernos chovosos e ventos fortes. A coccidioidomicose grave e disseminada acomete 10 a 20 vezes mais os pacientes de cor negra e orientais do que aqueles de cor branca. Essa maior suscetibilidade dos indivíduos parece estar relacionada ao grupo sanguíneo B e ao antígeno de histocompatibilidade HLA-A9. Não há predomínio de idade, contudo, formas graves são frequentemente observadas em pacientes pediátricos e pacientes do sexo masculino, acima de 50 anos. Agricultores, operários e construtores e arqueólogos estão mais expostos à doença. A coccidiodimicose animal é também bastante comum em áreas endêmicas. Caninos, equinos, roedores e primatas são os mais comprometidos. O isolamento de *C. immitis/C. posadasii* do solo de ninhos de roedores selvagens e de tocas de tatu (nordeste brasileiro) tem sido relatado.

Clínica e patologia

A infecção pelo *C. immitis/C. posadasii* ocorre depois da inalação de grande quantidade de artrósporos infectantes em supensão no ar ou, menos frequentemente, após a inoculação tegumentar. No organismo dos hospedeiros, os artrósporos

convertem-se em esférulas com múltiplos endósporos, que são liberados para o meio externo pela ruptura da parede da célula parental. Todavia, ocasionalmente, elementos hifálicos têm sido encontrados em cavidades pulmonares. A reação celular à infecção pelo *C. immitis/C. posadasii* pode ser piogênica, granulamatosa ou mista. Inicialmente, a resposta tecidual no foco primário da infecção é caracterizada pela presença de polimorfonucleares (neutrófilos ou eosinófilos); Em seguida, surge um infiltrado mononuclear que se mantém durante todo o processo e onde um granuloma pode ser produzido. Uma infecção subclínica ou de gravidade moderada com rápida resolução, e que confere forte imunidade contra a reinfecção, é observada. Formas crônicas, progressivas ou disseminadas da doença podem também ocorrer. Na coccidioidomicose pulmonar primária, cerca de 60% dos indivíduos infectados são assintomáticos, mas aqueles que desenvolvem sintomas, em geral, após uma a quatro semanas, apresentam uma síndrome gripal com febre, dor pleural, tosse, expectoração purulenta ou sanguinolenta, mal-estar, dor de cabeça, fadiga, mialgia, suor noturno, disfagia e perda de apetite. Alguns pacientes, notadamente os do sexo feminino, podem, ainda, desencadear um *rash* cutâneo maculopapular ou eritematoso (eritema multiforme ou nodoso), na região do tronco e dos membros, bem com artralgia com impotência funcional e tumefação, em várias articulações (reumatismo do deserto). A radiografia de tórax frequentemente está alterada, mostrando mínimo infiltrado, nódulos simples ou múltiplos, linfadenopatia hilar e mediastinal, efusão pleural e cavidades de paredes delgadas que fibrosam e calcificam. A bola fúngica tem sido descrita em lesões cavitárias. Normalmente, a resolução dos processos está presente após três semanas. No entanto, pode haver persistência de sintomas (oito semanas) e agravamento da infecção. A coccidioidomicose pulmonar crônica é caracterizada por um processo benigno com formação de nódulos, cavidades e coccidioidoma, bem como uma doença progressiva que envolve pacientes imunocomprometidos. Esses nódulos são esféricos, densos e medianamente localizados nos campos pulmonares. Além disso, são assintomáticos e podem conter organismos fúngicos viáveis, funcionando como focos quiescentes. Comumente, as lesões cavitárias são únicas, apresentam paredes finas e cursam com tosse seca e hemoptise. Fístulas broncopleurais, pneumotórax e empiema coccidioidal são complicações decorrentes de cavidades pulmonares. Reações de hipersensibilidade aos antígenos do *C. immitis/C. posadasii* podem dar origem a coccidioidomas, que são nódulos pulmonares esféricos ou globosos envolvidos por uma grossa parede fibrótica e calcificação. Em seu interior, podem ser encontradas esférulas ou, algumas vezes, hifas e artrósporos viáveis ou parcialmente inativados e material caseoso. O esvaziamenteo natural do conteúdo dos coccidioidomas pode também dar origem a cavidades. Desnutrição, alcoolismo, idade avançada, doença pulmonar obstrutiva crônica ou imunocomprometimento podem desestabilizar a forma crônica residual, produzindo uma coccidioidomicose pulmonar progressiva. Essa condição clínica pode se apresentar como uma pneumonia coccidiódica progressiva, que se desenvolve muito lentamente e cursa com tosse, expectoração mucopurulenta, hemoptise, dispneia, astenia, anorexia e dor toráxica ou, ainda, como uma coccidioidomicose miliar, que evolui de forma rápida com febre, mal-estar, astenia e dispneia. Esporadicamente, há envolvimento do sistema nervoso central e morte. O espalhamento hematogênico leva à coccidioidomicose disseminada. Formas agudas, subagudas ou crônicas e também fatais têm sido descritas. Lesões de pele e tecido subcutâneo se apresentam como pápulas verrucosas, úlceras, tratos sinuosos drenantes e abscessos. Comprometimento ósseo (vértebras, fêmur, tíbia, úmero e joelho) pode ocorrer por contiguidade e desencadear uma meningoencefalite. Linfonodos, baço, fígado e glândula adrenal são outros sitios anatômicos acometidos. Manifestações clínicas como peritonites, epididimites, orquites, prostatites, cistites, laringites, otites e abscessos renais são menos frequentemente descritas.

Diagnóstico laboratorial

Devido ao elevado risco de infecção ocupacional, o laboratório deve ser informado da suspeita de coccidioidomicose, para que o manejo do *C. immitis/C. posadasii* (classe 3) seja feito obedecendo-se à mais estrita norma de biossegurança.

- **Exame direto e histopatologia:** a detecção tecidual de esférulas de 10 a 80 μm de diâmetro, paredes espessas (2 μm) e com endósporos (2 a 5 μm), no exame microscópico direto com KOH 10% a 30% ou nas secções histopatológicas coradas pela hematoxilina e eosina (HE), Gromori-Grocott (prata), ácido periódico de Schiff (PAS) ou Gridley, permite o diagnóstico de coccidioidomicose. A presença de massas de hifas e esférulas pode ser observada em lesões pulmonares cavitárias. Polén, glóbulos de gordura, células do hospedeiro e elementos leveduriformes do *B. dermatitidis* podem mimetizar esférulas jovens ou endósporos de *C. immitis/C. posadasii* nos tecidos, quando preparações a fresco são empregadas.
- **Cultura:** O isolamento primário do *C. immitis/C. posadasii* não apresenta maiores dificuldades. Esse fungo cresce bem nos meios de cultivo habitualmente empregados no laboratório de micologia. Podem ser utilizados Ágar infusão de cérebro-coração (BHIA), ágar de Sabouraud dextrosado (SDA)/caldo infusão de cérebro-coração (BHI) e ágar de Sabouraud dextrosado, acrescidos ou não de antimicrobianos e, preferencialmente, acondicionados em tubos de ensaio com tampa de rosca. O material deve ser incubado à temperatura de 25 a 30 °C por até 4 semanas. Em geral, uma colônia filamentosa está presente em 2 a 7 dias e as estruturas de reprodução do fungo estão formadas em 15 a 20 dias. A micromorfologia da fase micelial do *C. immitis/C. posadasii* é caracterizada pela presença de hifas septadas, hialinas e ramificadas, com produção de artrósporos. Esses artrósporos (2 a 4 × 3 a 6 μm) são produzidos nas ramificações das hifas e apresentam um aspecto retangular ou elipsoide e uma parede delgada. A esporulação pode ser estimulada com a utilização do ágar extrato de levedura-glicose. A obtenção da fase de esférulas não é usual e a confirmação do diagnóstico pode ser feita pela prova do exoantígeno.

Coccidioides immitis Rixford et Gilchrist, 1986.

Fase filamentosa:

- **Morfologia macroscópica:** crescem moderada a lentamente, atingindo a maturidade em 10 dias (o crescimento ocorre em 3 a 5 dias, mas a produção de artrósporos pode levar de 1 a 2 semanas). O *C. immitis*, em geral, produz colônias com textura e pigmentação variáveis. A colônia é, inicialmente, úmida, glabrosa ou membranosa e de coloração cinza. Um crescimento aéreo branco é formado, dando um aspecto flocoso ou algodonoso, velutino, pulverulento ou granular. Com o tempo, o micélio aéreo torna-se cinza esverdeado, amarelo canela ou marrom. A superfície da colônia pode ser lisa, rugosa ou com zoneamentos e sua margem pode apresentar-se com franjas ou lobulada. Um pigmento difusível pode ser evidente em alguns isolados. O reverso da colônia varia de branco a laranja ou marrom.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são septadas, ramificadas, finas ou moderadamente espessas. A conidiação começa em 5 a 10 dias, após iniciado o crescimento. Os esporos aparecem em ramificações laterais em ângulos retos das hifas vegetativas. Essas ramificações são altamente septadas, de paredes espessas e de diâmetro duas vezes maior do que o diâmetro das hifas principais. Artrósporos de paredes espessas são produzidos ao longo dessas ramificações, intercalados com células também de paredes espessas, mas sem conteúdo citoplasmático, chamadas de disjuntoras. Os artrósporos são em forma de barril, medem de 2,5 a 4 × 3 a 6 μm e são liberados pela fragmentação e desarticulação da hifa. Quando liberados, os artrósporos carregam um pequeno fragmento da parede celular dos disjuntores. Em alguns isolados, as ramificações que dão origem aos esporos podem ocorrer em cachos dispostos em ângulos agudos e apicalmente na hifa, o que dá uma aparência de "galhos de árvore". Nenhum outro tipo de esporos, além dos artrósporos, é produzido. Pode ser encontrado o micélio em raquete.

Fase de esférulas:

- **Morfologia microscópica:** em meio de conversão a 37 a 40 °C e sob tensão de CO_2, esférulas maduras com endósporos são produzidos em 4 a 5 dias. As esférulas são grandes, arredondadas, de paredes espessas, e medem em torno de 15 μm. Os endósporos variam de 2 a 5 μm. Importa mencionar que o *C. posadasii* é indistinguível fenotipicamente do *C. immitis*, tanto em cultura quanto no tecido.

- **Métodos não culturais:** o diagnóstico e o controle da coccidioidomicose podem ser realizados a partir de provas sorológicas para a detecção de anticorpos circulantes no sangue e dos líquidos cefalorraquidiano, pericárdico, pleural e articular. Para o diagnóstico e/ou confirmação do diagnóstico e prognóstico, são úteis a fixação do complemento e a precipitação em tubo. A aglutinação em látex e imunodifusão são utilizadas como provas de seleção para o diagnóstico inicial. O teste cutâneo é amplamente utilizado para estudos epidemiológicos e somente é de valor diagnóstico em pacientes com história de reação negativa. Antígenos tubo-precipitante e fixador de complemento são os dois principais grupos de antígenos utilizados na detecção de anticorpos. Os antígenos empregados são a coccidioidina (fração estável e/ou fração termolábel) produzida a partir de filtrados da fase micelial do *C. immitis /C .posadasii* e a esferulina obtida de material citoplasmático da fase de esférulas. A produção de IgM (doença primária aguda) pode ser mensurada pela técnica de aglutinação em látex, precipitação em tubo, imunodifusão, ensaio imunoenzimático e imunoeletroforese, e a produção de IgG (doença crônica) pela fixação de complemento. A radiografia de tórax pode comprovar infiltrados lobulares e segmetares, adenopatia hilar, efusão pleural, nódulos, cavitações, bronquiectasias e calcificações. O envolvimento ósseo, articular e de tecidos moles adjacentes pode ser delineado pela ressonância magnética. Abscessos cerebrais, meningites, hidrocefalia e obstrução vascular podem ser avaliadas pela tomografia computadorizada e ressonância magnética.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação deve ser feita com infecções por *Mycoplasma* sp., *Chlamydiapsittaci*, *Mycobacteriumavium-intracelullare*, *Staphylococcus aureus* e *Pneumocytis jiroveci*, tuberculose, sífilis, esporotricose, histoplasmose, paracoccidioidomicose, blastomicose norte-americana, criptococose, neoplasias pulmonares, osteomielites e meningites bacterianas e fúngicas.

Prognóstico e tratamento

A coccidioidomicose primária apresenta um bom prognóstico, tendo em vista que a grande maioria dos casos apresenta recuperação. No entanto, é grave nas formas progressivas que acometem indivíduos imunocomprometidos graves e em meningoencefalites, pela destruição tecidual e falta de resposta ao tratamento. Aquimioterapia antifúngica inclui cetoconazol, fluconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol e anfotericina B deoxicolato ou suas formulações lipídicas para as formas graves. Além disso, podem ser necessárias terapias com corticoesteroides para as formas alérgicas e cirurgia para os processos residuais benignos.

■ CRIPTOCOCCOSE

Etiologia e epidemiologia

A criptococose é uma infecção sistêmica de evolução crônica, subaguda e menos frequentemente aguda. Acomete indivíduos imunocompetentes, porém, é mais prevalente em indivíduos com falhas em seus mecanismos de defesa. Formas pulmonares, meningoencefálicas ou disseminadas são as mais descritas. Os agentes etiológicos dessa condição são as leveduras encapsuladas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (complexo *C. neoformans-C. gatii*). A espécie *C. neoformans* apresenta duas variedades, a *C. neoformans* var. *neoformans* e

a *C. neoformans* var. *grubii*. O *C. gattii* não apresenta, todavia, nenhuma variedade.

Classicamente, esses fungos exibem cinco sorotipos, denominados A, B, C, D e AD. O sorotipo A (haploide) está relacionado ao *C. neoformans* var. *grubii* e o sorotipo D (haploide) está associado ao *C. neoformans* var. *neoformans*. Os sorotipos B e C (haploides) são encontrados na espécie *C. gattii*. O sorotipo AD (diploide ou aneuploide) é um híbrido intervariedades (*C. neoformans* var. *grubii* x *C. neoformans* var. *neoformans*). Diferenças na estrutura dos polissacarídeos capsulares determinam naturezas antigênicas específicas e explicam os tipos sorológicos. Essas diferenças também parecem condicionar o tipo de síndrome ou manifestação clínica da criptococose. A formação de tumores ou granulomas (criptococomas) e a menor resposta à quimioterapia antifúngica são tendências observadas em *C. gattii*, enquanto a produção de lesões cutâneas está mais associada ao *C. neoformans.*

A fase sexuada ou teleomórfica das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* pertence ao Filo Basidiomycota e é conhecida como *Filobasidiella* (*F. neoformans*/*C. neoformans* e *C. bacillispora*/*C. gattii*). Esses fungos apresentam dois tipos sexuais ou conjugantes (*mating types*), representados pelos *mating types a* e α que regulam geneticamente a compatibilidade sexual e a reprodução sexuada. Tipicamente, *C. neoformans* e *C. gattii* exibem caracteres de sexualidade diferentes entre os indivíduos.

Com base em estudos de Biologia Molecular (*PCR fingerprinting*, *RFLP*, *AFLP* e *MLST*), tem sido determinado, ainda, vários genótipos para as espécies de *Cryptococcus*. O *C. neoformans* var. *grubii* (Sorotipo A) tem sido dividido nos tipos moleculares VNI (AFLP1) e VNII (AFLP1A, AFLP1B, VNB), *C. neoformans* var. *neoformans* (Sorotipo D) no tipo VNIV (AFLP2), *C. neoformans* híbrido intervariedade AD no tipo VNIII (AFLP3) e *C. gattii* (Sorotipos B/C) nos tipos VGI (AFLP4/Sorotipo B) ,VGII (AFLP6/Sorotipo B),VGIII (AFLP5/Sorotipo C), VGIV (AFLP7/Sorotipo C) e VGIV/VGIIIc (AFLP10/Sorotipo B). Além desses, foram determinados tipos moleculares para os híbridos *C. neoformans* var. *neoformans* × *C. gattii* AFLP4/VGI Híbrido (AFLP8/ Híbrido DB), *C. neoformans* var. *grubii* × *C gattii* AFLP4/VGI Híbrido (AFLP9/ Híbrido AB) e *C. neoformans* var. *grubii* × *C gattii* AFLP6/VGII Híbrido (AFLP11/ Híbrido AB).

Recentemente, em decorrência do uso de técnicas filogenéticas e moleculares, uma nova classificação para esse gênero foi proposta (Quadro 63.2). Para *C. neoformans* var. *grubii*

Quadro 63.2 Nomenclatura proposta para o complexo *C. neoformans-C. gattii*.

Nome atual	PCR Fingerprinting	AFLP	MSLT	Nome proposto
Cryptococcus neoformans var. *grubii* – Sorotipo A	VNI VNII VNII	AFLP1 AFLP1A/VNB AFLP1B	Clado F Clado G Clado H	*Cryptococcus neoformans sensu stricto*
Cryptococcus neoformans var. *neoformans* – Sorotipo D	VNIV	AFLP2	Clado I	*Cryptococcus deneoformans*
Cryptococcus neoforman Híbrido AD	VNIII	AFLP3	-	*Cryptococcus neoforman* × *Cryptococcus deneoformans* Híbrido AD
Cryptococcus gattii – Sorotipo B	VGI	AFLP4	Clado D	*Cryptococcus gattii sensu stricto*
Cryptococcus gattii – Sorotipo C	VGIII	AFLP5	Clado C	*Cryptococcus bacillisporus*
Cryptococcus gattii – Sorotipo B	VGII	AFLP6	Caldo A	*Cryptococcus deuterogattii*
Cryptococcus gattii – Sorotipo C	VGIV	AFLP7	Clado E	*Cryptococcus tetragattii*
Cryptococcus gattii – Sorotipo B	VGIV/VGIIIc	AFLP10	Clado B	*Cryptococcus decagattii*
Cryptococcus neoformans var. *neoformans* × *Cryptococcus gattii* AFLP4/VGI Híbrido DB	-	AFLP8	-	*Cryptococcus deneoformans* × *Cryptococcus gattii* híbrido
Cryptococcus neoformans var. *grubii* × *Cryptococcus gattii* AFLP4/VGI Híbrido AB	-	AFLP9	-	*Cryptococcus neoformans* × *Cryptococcus gattii* Híbrido
Cryptococcus neoformans var. *grubii* × *Cryptococcus gattii* AFLP6/VGII Híbrido AB	-	AFLP11	-	*Cryptococcus neoformans* × *Cryptococcus deuterogattii* Híbrido

(VNI, VNII) foi proposto o nome *C. neoformans stricto sensu;* para *C. neoformans* var. *neoformans* (VNIV) foi proposto *C. deneoformans;* para *C. neoformans* híbrido AD (VNIII) foi proposto *C. neoformans* × *C. deneoformans* híbrido; para *C. gattii* foram propostos os nomes *C. gattii sensu stricto* (VGI), *C. bacillisporus* (VGIII*), C. deuterogattii* (VGII), *C. tetragattii* (VGIV) e *C. decagatii* (VGIV/VGIIIc); para *C. neoformans* var. *neoformans* × *C gattii* AFLP4/VGI Híbrido (AFLP8) foi proposto *C. deneoformans* × *C gattii* Híbrido; para o *C. neoformans* var. *grubii* × *C gattii* AFLP4/VGI Híbrido (AFLP9) foi proposto *C. neoformans* x *C gattii* Híbrido; e para *C. neoformans* var. *grubii* × *C gattii* AFLP6/VGII Híbrido (AFLP11) foi proposto *C. neoformans* × *C deuterogattii* Híbrido.

Cryptococcus neoformans é de distribuição mundial, sendo, normalmente, encontrado em associação com dejetos de aves (principalmente de pombos), solos contaminados com esses dejetos, frutas e outros materiais vegetais. Essa associação parece ocorrer pelo fato de a excreta de aves conterem creatinina, que é utilizada seletivamente como fonte de nitrogênio pelo *C. neoformans*. O *C. gattii* está mais limitado a áreas tropicais e subtropicais e é encontrado no ambiente associado ao *Eucalyptus camaldulensis*. Na natureza, o reservatório da fase sexuada dessas leveduras parece ser o material vegetal em decomposição, mais do que os dejetos de animais.

A maioria dos isolados clínicos é do sorotipo A, mesmo em locais onde *C. gattii* é preponderante. Apesar do sorotipo D ser mais frequente em alguns países europeus (Alemanha, Dinamarca, Suíça e Itália), sua incidência é extremamente baixa em outras regiões do mundo. Com relação ao sorotipo B, este apresenta maior frequência de isolamento, quando comparado ao sorotipo C. Dentre os dois *mating type* da fase sexuada (a, a), a é o mais prevalente, tanto em amostras clínicas quanto naquelas ambientais, bem como parece ser mais virulento.

A exposição dos hospedeiros às leveduras e blastósporos de *C. neoformans* e *C. gattii* e aos basidiósporos de suas fases sexuadas em suspensão no ar é a principal fonte de infecção. Áreas como torres, campanários e sótãos habitados por aves são críticas para a aquisição da doença. A criptococose causada pelo *C. neoformans* ocorre, primariamente, em pacientes com Aids, contudo, *C. gattii* acomete, com mais frequência, aqueles indivíduos imunocompetentes, sendo um de seus principais fatores de risco a terapia maciça com corticoides e citostáticos. A maior incidência de *C. neoformans* em pacientes aidéticos parece estar relacionada ao fato de esses indivíduos estarem mais concentrados em áreas urbanas e não em áreas rurais, onde poderiam ser expostos ao *Eucalipto camaldulensis,* que é o reservatório de *C. gattii*.

Atualmente, com a introdução da terapia antirretroviral de alta potência (HAART), que reduziu a viremia e elevou a contagem de CD4+, melhorando a condição imunológica dos pacientes com Aids, a incidência de criptococose no grupo de pacientes aidéticos vem diminuindo de maneira considerável. No entanto, pacientes com neoplasias sólidas e hematológicas e os transplantados de órgãos e medula óssea passaram a ser uma importante população de risco. Leucemias e seus tratamentos e transplantes de fígado e rins são alguns dos fatores predisponentes.

Clínica e patologia

A inalação de elementos fúngicos do *C. neoformans e C. gattii* pode dar início à infecção. A exposição ambiental aos propágulos dessas leveduras pode levar, dependendo do tamanho do inóculo, da virulência das cepas e da condição imunológica do hospedeiro, à resolução da infecção, ao desenvolvimento de uma infecção latente (assintomática) com reativação posterior ou desencadear um processo sintomático crônico ou agudo. Contudo, diferenças clínico-laboratoriais entre a criptococose que acomete pacientes infectados pelo HIV e aqueles não infectados são observadas. Maior envolvimento extrapulmonar e do sistema nervoso central, altas taxas de positividade em tinta da China e em hemoculturas e menor quantidade de células inflamatórias no líquido cefalorraquidiano são características de pacientes aidéticos.

Normalmente, os mecanismos de defesa dos hospedeiros são efetivos no controle e na prevenção da criptococcose. A elevada prevalência de infecção assintomática na população e a baixa incidência de criptococose-doença comprovam esse fato. A principal célula efetora contra essas leveduras são os macrófagos. Essas células estão relacionadas à fagocitose e à inativação intracelular, bem como à produção de citocinas pró-inflamatórias. Outras células que contribuem para a defesa do organismo são células gigantes, neutrófilos, eosonófilos, células *natural killer* e linfócitos T. A defesa humoral parece, igualmente, colaborar na resposta contra o fungo. A opsonização torna mais eficiente a fagocitose, aumenta a ação das células *natural killer* e contribui para a destruição da cápsula de polissacarídeo. No entanto, o fungo pode apresentar alguns mecanismos de escape. Uma intensa reação granulomatosa e de necrose caseosa podem estar presentes no foco infeccioso e a formação dos granulomas pode permitir que o fungo se mantenha viável dentro da célula fagocitária por longo tempo, em um estado de latência. Além disso, a infecção pode ser ainda favorecida pela modulação negativa da resposta imunológica do hospedeiro, pelo polissacarídeo capsular e de sacarídeos extracelulares (manitol), melanina e prostaglandinas. Essas substâncias podem interferir na migração de leucócitos, produção de citocinas, fagocitose e metabolismo oxidativo intracelular.

Esses fungos podem acometer qualquer tecido, produzindo manifestações clínicas de caráter variado. O órgão mais afetado é o pulmão, contudo, disseminações hematogênicas podem conduzir a levedura ao cérebro e às meninges. Outros sítios de importância são pele, próstata e olhos. A infecção pulmonar pode se apresentar subclínica ou mostrar sintomas de pneumonia aguda. Pacientes assintomáticos podem exibir uma forte colonização de sua árvore brônquica pelo *C. neoformans*. Todavia, esse fungo não é considerado um membro da microbiota humana. A existência de uma doença pulmonar crônica aumenta o percentual de isolamento do *C. neoformans* colonizante. Frequentemente, o diagnóstico de infecção pulmonar é secundário ao diagnóstico de meningite. Em indivíduos imunocompetentes, a criptococose dos pulmões é um processo indolente cujos principais sintomas são tos-

se produtiva, dor torácica, dispneia, dor de cabeça, perda de peso e febre. Nos pacientes imunocomprometidos, a infecção progride mais rapidamente, permanecendo no parênquima pulmonar ou se disseminado para o sistema nervoso central. Nesses pacientes, os sintomas constitucionais se apresentam com maior intensidade. As imagens radiológicas são inespecíficas, constituindo-se, comumente, de infiltrados intersticiais localizados e nódulos solitários. A infecção meningoencefálica é, de início, indolente, insidiosa ou abrupta, no caso de pacientes imunocomprometidos. O sintoma mais frequente é a cefaleia difusa, bilateral, severa e intermitente. Sonolência, letargia, perda de memória e confusão mental, irritabilidade, visão dupla, náuseas e vômitos são também descritos. Granulomas (criptococomas) abscessos cerebrais, sinais de hidrocefalia e hipertensão intracraniana e coma podem ser complicações importantes. A punção lombar mostra um líquido cefalorraquidiano claro, hipertenso, com hiperproteinorraquia, níveis baixos de glicose e cloretos e pleocitose com linfócitos. A doença pode ser fulminante, se não houver intervenção médica e farmacológica. De qualquer forma, elevadas taxas de mortalidade estão associadas á meningite pelo *C. neoformans*. A criptococose cutânea pode ser decorrente de infecção primária ou disseminação, o que é mais frequente. Tipicamente, as lesões são polimórficas, únicas ou múltiplas, e se apresentam como pápulas, pústulas, vesículas, nódulos, abscessos, granulomas, placas, tratos sinuosos, fístulas, úlceras e celulites. Também são observadas afecções que simulam acne, molusco contagioso e herpes. Os sítios mais acometidos são cabeça, pescoço, tronco e membros. Em indivíduos imunocompetentes, as lesões são chancriformes e limitadas, enquanto nos imunocomprometidos são profundas, progressivas e necróticas. A resolução espontânea é rara e lesões não tratadas tendem a desenvolver meningoencefalites. Têm sido relatadas infecções de próstata e pielonefrites em pacientes portadores de HIV. Falhas na quimioterapia antifúngica e recidivas parecem estar relacionadas ao fato de a próstata funcionar como reservatório para o *C. neoformans*. Culturas de urina, com frequência, são positivas nesses pacientes. Uma infecção ocular (endoftalmite) também pode estar presente na criptococose. Normalmente, esse processo é secundário à menigoencefalite ou uma consequência de disseminações hematogênicas de outros sítios. As manifestações clínicas incluem escótomo, atrofia do nervo óptico, paralisia motora, papiloedema e coriorretinite. A perda de visão é uma sequela dessa condição. Dois mecanismos estão relacionados ao comprometimento visual. Um rápido decréscimo da visão pode ser decorrente da neurite causada pela infecção do nervo óptico e uma lenta diminuição da capacidade visual pode ser devido ao aumento da pressão craniana interna. Queratites ou infecções por fontes exógenas de *C. neoformans* podem ocorrer por implantação traumática ou iatrogenia. Um conjunto de alterações como criptocococemia, osteomielites (crânio, vertebras, costelas, pelve) e artrites, peritonites, miosites, endocardites (iatrogênicas ou por disseminações), miocardites e pericardites, vasculites e aneurismas, estomatites, gastrenterites e hepatites, lesões genitais e mastites, lesões de glândula suprarrenal e tiroidites e linfoadenopatias são também observadas na criptococose disseminada tanto em pacientes imunocomprometidos quanto em imunocompetentes.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

- **Exame microscópico direto e histopatologia:** um diagnóstico presuntivo de criptococose pode ser obtido com a visualização no tecido de células de levedura (5 a 10 μm) globosas, elípticas ou em forma de limão, gemulantes e envolvidas por uma cápsula de polissacarídeo. Escarro e pus, bem como espécimens encefálicos devem ser macerados com KOH 10%. A utilização de tinta da China permite a pronta observação da estrutura capsular em líquido cefalorraquidiano, urina e demais fluidos e secreções do organismo. Um controle positivo com KOH 10% ou 20% deve ser feito conjuntamente com a técnica da tinta da China, para diminuir a ocorrência de falso-positivos nessa técnica, já que artefatos teciduais podem estar presentes e simularem as estruturas de *C. neoformans*/*C. gattii*. A histopatologia de espécimens de biópsia ou autópsia pode ser procedida, empregando o mucicarmim de Meyer, que permite a detecção da cápsula de *C. neoformans*/*C.gattii*. No entanto, outras preparações de hematoxilia e eosina (HE), Gromori-Grocotti (prata) e ácido periódico de Schiff (PAS) apenas permitem a visualização da célula de levedura e não detectam claramente a cápsula fúngica. Espaços vazios em torno dos elementos leveduriformes são observados com essas técnicas. Gram e Giemsa também não são adequados à visualização da cápsula. Fontana-Masson pode ser utilizada para a detecção de *C. neoformans*/*C. gattii*, pois produz uma coloração marrom-avermelhada específica.
- **Cultura e provas bioquímicas:** o isolamento primário de *C. neoformans* e *C.gattii* pode ser conseguido a partir da inoculação dos espécimens em meios de rotina, como o ágar de Sabouraud dextrosado (SDA), ágar infusão de cérebro-coração (BHIA) e ágar sangue suplementados com cloranfenicol, mas sem cicloheximida, e incubados por 25 °C a 30 °C, por 24 a 72 horas. Após esse tempo de incubação, uma colônia leveduriforme de aspecto mucoide e coloração creme-acinzentada está presente. Células de levedura encapsuladas e blastósporos semelhantes aos elementos fúngicos teciduais podem ser visualizados pelo exame microscópico direto. Hemoculturas devem ser procedidas utilizando o sistema de lise-centrifugação. Em conjuto com os meios de isolamento, deve ser empregado o ágar semente de niger ([agar dopa, ágar dopamina e ágar ácido cafeico) para a detecção de fenol-oxidase, por meio da produção de colônias amarronzadas. Os radicais fenólicos presentes no meio são oxidados à melanina, escurecendo as colônias brancas. A atividade da urease pode ser confirmada em provas como a urease rápida ou a urease rápida-seletiva, pela observação da mudança da cor do meio que passa à púrpura. Para a determinação das duas espécies, deve ser empregado o ágar canavanina-glicina-azul de bro-

motimol (CGB). Nessa prova, a espécie *C. gattii* utiliza a glicina como única fonte de carbono e é resistente à canavanina. Ao desdobrar a glicina, o meio é alcalinizado e se torna azul. A espécie *C. neoformans* não utiliza a glicina e é sensível à canavanina; por isso, não alcaliniza o meio, que se mantém com a coloração original.

Cryptococcus neoformans (Sanfelice) Vuillemin 1901.

- **Morfologia macroscópica:** cresce rapidamente, atingindo a maturidade em três dias. Em ágar de Sabouraud dextrosado (SDA) ou ágar extrato de malte, as colônias são lisas, planas ou levemente elevadas, brilhantes, úmidas, mucoides (a quantidade de muco está ligado ao grau de formação de cápsulas) e com bordas lisas. A cor é branca, inicialmente, tornando-se bege (aspecto de "leite condensado"). Crescem bem a 30 °C e 37 °C. Em ágar semente de níger, as colônias produzidas em 1 a 5 dias são marrom-escuras. Em ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), a espécie *C. neoformans* produz colônias de cor branca, e a espécie *C. gattii*, colônias de cor azul.
- **Morfologia microscópica:** em ágar de Sabouraud dextrosado (SDA) e ágar extrato de malte, a 30 °C, a espécie *C. neoformans* produz células gemulantes, globosas a ovais, e que medem de 2,5 a 10 µm de diâmetro. A espécie *C. gattii* produz células gemulantes, ovais ou em forma de limão, que medem 3 e 5 × 3 a 7 µm, além de células globosas. A 37 °C, *C. gattii* produz células mais alongadas. A espessura das cápsulas, contudo, é variável. Nem pseudohifas e micélio verdadeiro são produzidos em ágar cornmeal com tween 80. Na reprodução sexuada, contudo, ocorre filamentação para a formação das basídias e dos basidiósporos.

- **Métodos não culturais:** a detecção de antígeno capsular em líquido cefalorraquidiano e outros líquidos orgânicos (soro sanguíneo, urina e lavado broncoalveolar) é um importante apoio no diagnóstico de criptococose invasiva. Comumente, o antígeno capsular é detectado pela técnica de aglutinação em látex, que tem se mostrado altamente específica e sensível (90%). Por essa técnica, 99% das criptococoses meningoencefálicas e 67% das criptococoses disseminadas são rapidamente diagnosticadas. Resultados positivos podem ser oferecidos antes mesmo do isolamento do fungo em cultura. Além do diagnóstico, a aglutinação em látex pode ser empregada também para o seguimento de pacientes em tratamento, permitindo o monitoramento da resposta clínica ao protocolo antifúngico utilizado. Reações falso-positivas podem ocorrer com infecções disseminadas pelo *Trichosporon* spp. e outros microrganismos. Por sua vez, reações falso-negativas podem ser decorrentes de infecção em estágio inicial, baixo título, presença de complexos imunes, efeito prozona e cepas com cápsulas de pequenas dimensões. Em geral, os percentuais de falso-negativos são maiores em pacientes imunocompetentes, tendo em vista que as células fúngicas estão em pequena concentração nos tecidos afetados. Além da aglutinação em látex, o ensaio imunoenzimático com anticorpos monoclonais tem sido também utilizado para a detecção de antígeno capsular. Dentre as vantagens dessa metodologia estão a rapidez e a especificidade, pois não demonstra reações cruzadas com lúpus e fator reumatoide, observadas no látex, bem como sua possibilidade de utilização em urina de paciente com critptococose meningoencefálica. A detecção de anticorpos circulantes é de limitado valor para o diagnóstico ou tratamento da critococose invasiva, principalmente em pacientes com déficit de sua resposta imunológica. Uma variedade de aspectos lesionais podem ser observados na radiografia pulmonar. Infiltrados, nódulos, efusão pleural e linfoadenopatia hilar são frequentes. Em pacientes imunocomprometidos, infiltrados intersticiais difusos ou focais, podem ser visualizados efusão pleural e lesões endobronquiais, mas a adenopatia hilar pode não estar presente. Hidrocefalia, nódulos miliares e criptococomas símples ou múltiplos podem ser detectados por tomografia computadorizada. A atrofia cortical pode ser observada em pacientes aidéticos. Dentre as anormalidades meningoenefálicas detectadas por ressonância magnética podem ser visualizados nódulos leptomeningeais e parenquimais múltiplos. Estudos comparativos têm demostrado que a ressonância magnética é mais efetiva na detecção de alterações do sistema nervoso central do que a tomografia computadorizada. Achados radiológicos e tomográficos normais não excluem a possibilidade de infecção no sistema nervoso central.

Diagnóstico diferencial

A criptococose invasiva simula neoplasias sólidas, apresentando sinais clínicos de massa tumoral em expansão, principalmente quando acomete o sistema nervoso central e os pulmões. Meningites por bactéria (*Actinomyces* sp., *Brucella* sp., *Listeria* sp. e *Mycobacterium tuberculosis*), fungos (*Coccidioides immitis/Coccidioides posadasii*, *Histoplasma capsulatum* e complexo *Sporothrix schenckii),* toxoplasmose e linfoma devem ser diferenciados dos processos causados por *C. neoformans/C. gattii*. Lesões cutâneas podem ser semelhantes ao molusco contagioso, carcinoma de célula basal, carcinoma de célula escamosa e sarcoidose. Com frequência, a doença pulmonar é indistinguível clinica e radiologicamente de outras patologias pulmonares.

Prognóstico e tratamento

O prognóstico varia de bom a reservado, em lesões pulmonares de pacientes imunologicamente competentes. No entanto, o prognóstico passa a ruim quando o fungo atinge o sistema nervoso central, como consequência de espalhamento hematogênico. A doença disseminada é fatal em pacientes debilitados não tratados. A criptococose cutânea primária

tem bom prognóstico, podendo apresentar, inclusive, cura espontânea, mas aquela decorrente de disseminações a partir de focos menigoencefálicos é de mau prognóstico. A elevada carga parasitária determinada por métodos micopatológicos e sorológicos (≥ 1:1024) e a baixa resposta inflamatória (< 20 células/mL) também indicam um prognóstico ruim. Mortes ou recidivas estão associadas com resultados positivos em tinta da China, baixas contagens de leucócitos, baixos níveis de glicose ou níveis anormais durante a terapia com antifúngicos, ausência de anticorpos anti-*Cryptococcus*, títulos iniciais para antígeno capsular maiores do que 32 e, após tratamento, maiores do que 8 ou, ainda, reduzido decréscimo nos títulos durante a quimioterapia antifúngica, hipertensão do líquido cefalorraquidano, isolamento extraneural de *C. neoformans/C. gattii* e corticoterapia. Do mesmo modo, o *status* mental e neurológico do paciente condiciona o prognóstico. Um outro importante fator para a o sucesso ou o fracasso da quimioterapia antifúngica dos processos meningoencefálicos é o controle da doença de base. O tratamento das infecções por *C. neoformans/C. gattii* emprega a quimioterapia antifúngica com anfotericina B e suas formulações lipídicas, 5-fluoricitosina em associação com a anfotericina B e derivados azólicos como miconazol, itraconazol, fluconazol, posaconazol e voriconazol, monitoramento da pressão intracraniana e terapia de reconstituição imunológica.

■ CROMOBLASTOMICOSE(CROMOMICOSE)

Etiologia e epidemiologia

A cromoblastomicose é uma infecção crônica do tecido cutâneo e subcutâneo de natureza benigna e que acomete principalmente membros inferiores, produzindo lesões tumefeitas, nodulares e verrucosas. Essa condição clínica é determinada por diversos fungos da família Dematiaceae, cuja principal característica é a presença de pigmentos melanoides na parede celular da hifa. Os agentes mais frequentes são *Cladophialophora carrionii, Fonsecaea pedrosoi, Fonsecaea compacta, Phialophora verrucosa* e *Rhinocladiella aquaspersa*. Outros patógenos isolados são *Exophiala jeanselmei, Exophiala spinifera* e *Wangiella dermatitides*. Apesar da morfologia em cultura ser distinta, todas essas espécies apresentam o mesmo aspecto morfológico (corpúsculo muriforme ou corpos fumagoides) em tecido. Os fungos da cromoblastomicose são encontrados em solo e vegetais em decomposição, estando amplamente distribuídos nos ecossistemas. A doença tem sido relatada em todas as partes do mundo, porém, é mais prevalente em áreas rurais tropicais e subtropicais da América e África. A maioria dos casos, ocorre no sexo masculino. Crianças e adolescentes são pouco acometidos, e a faixa etária mais afetada está entre 30 e 50 anos. A transmissão entre pessoas ou animais não tem sido observada.

Clínica e patologia

A implantação traumática com corpos vulnerantes de natureza vegetal parece ser a via de infecção da doença. Ao serem inoculados no tegumento, os elementos hifálicos dão origem a uma estrutura ovalada demácea e septada denominada corpúsculo muriforme (corpos fumagoides). A presença de pigmentos melanoides na parede celular dessas estruturas desempenha um importante papel na patogênese da infecção, pois inibe o mecanismo oxidativo intracelular dos fagócitos. Uma resposta granulomatosa e supurativa com neutrófilos, eosinófilos, células de Langerhans e linfócitos está presente no foco da infecção. Normalmente, as lesões comprometem epiderme, derme, tela subcutânea, vasos linfáticos e raramente membranas mucosas. De forma geral, essas lesões são unilaterais e afetam mais os membros inferiores e pés, porém, membros superiores e mãos, ombros, pescoço, face e nádegas podem ser também acometidos. Comumente, lesões de membros superiores são mais eritemato-escamosas e psoriaseformes, enquanto aquelas encontradas nos membros inferiores são mais exuberantes e supuradas. A disseminação da doença pode ocorrer por autoinoculação, contiguidade e por via linfática ou hematogênica. Lesões nodulares ou em placa são os dois principais padrões anatomoclínicos observados. Inicialmente, a lesão em placa é formada por uma pápula de coloração violácea a avermelhada ou acinzentada, e de consistência firme e elástica. Com o tempo, a pápula inicial progride, formando placas avermelhadas, elevadas, com centro plano e liso ou descamativo e cicatricial e bordas papilomatosa, verrucosa e hieperqueratótica, cobertas por uma crosta serohemática. A lesão nodular tem início como um pequeno nódulo avermelhado, elevado e com pele intacta que, posteriormente, se torna tumoral e apresenta uma superfície escamosa e verrucosa e/ou ulcerada. Essa massa tumoral é proeminente e apresenta um aspecto papilomatoso, semelhante à "couve-flor", crostoso. Tumorações múltiplas e confluentes frequentemente se desenvolvem no tegumento, produzindo grandes lesões. A invasão ungueal pode ser decorrente de lesões podais extensas. Podem estar presentes processos secundários que surgem ao longo dos vasos linfáticos e dos linfonodos. São raramente observadas metástase óssea e de mucosa oral e nasal. O desenvolvimento de carcinoma de células escamosas, linfangites obliterantes dos membros inferiores e infecção bacteriana secundária são importantes complicações da cromblastomicose. Podem ocorrer curas espontâneas com cicatrização atrófica e alteração na pigmetação cutânea ou hipertrófica com retração de pele.

Diagnóstico laboratorial

- **Exame microscópico direto e histopatologia:** o diagnóstico de cromoblastomicose pode ser feito pela visualização de células ovaladas (8 a 12 μm), demáceas, asseptadas ou septadas e de paredes espessas (corpúsculos muriformes/corpos fumagoides) em exame direto dos espécimens clínicos com KOH a 40%. Hifas demáceas e ramificadas (2 a 5 μm) podem também ser observadas na parte mais superficial das lesões cutâneas. Corpúsculos muriformes podem também ser observados em seções de tecido coradas pela hematoxilina e eosina (HE), dentro de células gigantes ou no espaço extracelular. Preparações com ácido periódico de Schiff (PAS) e Gromor-Grocott

(prata) permitem uma melhor detecção das estruturas parasitárias. Como essa morfologia tecidual é a mesma para os diferentes agentes, é necessário o isolamento em cultura para a identificação das espécies.

- **Cultura:** os fungos causadores de cromoblastomicose crescem sem maiores dificuldades nos meios de cultura habitualmente empregados em micologia médica. Podem ser utilizados ágar de Sabouraud dextrosado suplementado ou não com cloranfenicol e cicloheximida, ágar batata dextrosado (BDA) ou ágar malte. A incubação deve ser feita à temperatura de 25 °C a 30 °C, por até 4 semanas. Normalmente, uma colônia filamentosa demácea está presente em 1 a 3 semanas.

O estudo taxonômico dos agentes causais (*C. carrionii, F. pedrosoi, F. compacta, P. verrucosa* e *R. aquaspersa)* é complexo, tendo em vista o forte relacionamento filogenético dessas espécies. A semelhança dos aparelhos conidiais e a morfologia tecidual indistinguível oferecem certo obstáculo à identificação desses fungos. No entanto, três tipos principais de conidiação são encontrados nesse grupo e servem para uma identificação mais geral: tipo *Phialophora*, tipo *Cladosporium* e tipo *Rhincladiella*.

- ***Tipo Phialophora:*** neste tipo existe uma distinta célula conidiogênica (fiálide), que ocorre terminalmente ou ao longo do micélio. Essa estrutura é geralmente em forma de frasco e tem uma base arredondada, oval ou alongada, um "pescoço" estreito e uma abertura que pode ter um conspícuo colarete. Os conídios são formados na extremidade da célula e aí podem se acumular, dando um aspecto de "flores em um vaso". Esses esporos são ovais, de paredes lisas e não têm nenhuma cicatriz ou escara de liberação.
- ***Tipo Cladosporium:*** neste tipo de conidiação existe uma haste simples que serve de conidióforo. Ela é, usualmente, um pouco dilatada em sua porção distal. Dois ou mais conídios são formados em sua extremidade. Os conídios gemulam e formam conídios secundários em sua porção distal. A conidiação continua com a formação de uma longa cadeia. Os conídios liberados formam um espessamento ou cicatriz, denominada disjuntor, no local de suas conexões. Todos os conídios irão ter dois ou três disjuntores (quando formados em uma ramificação), exceto o conídio terminal da cadeia de esporos, que irá apresentar apenas um. Um conídio com três disjuntores é descrito como conídio em forma de "escudo". Desse modo, é possível, pelo exame microscópico cuidadoso, distinguir o tipo de conidiação envolvido. Hifas, conidióforos e conídios são escuros (marrom oliva).
- ***Tipo Rhinocladiella:*** os conidióforos são simples e algumas vezes não diferenciados da hifa vegetativa. Conídios ovais são produzidos irregularmente no topo e ao longo do conidióforo. Esses esporos são muito simples e não gemulam, contudo, podem ser vistas ocasionalmente, cadeias formadas por gemulação e formas de transição ao tipo *Cladosporium*. Quando os esporos são liberados, pode ser encontrada uma pequena cicatriz no conidióforo e no conídio, em seus sítios de ligação. As hifas, os conídios e conidióforos são marrom-esverdeado.

Fonsecaea pedrosoi (Brumpt) Negroni, 1936.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é lenta, atingindo a maturidade em 14 dias. A colônia produz uma coloração negra, negro-amarronzado, negro-acinzentado ou verde-oliva. A textura é velutina a penugenta e a superfície varia de plana a "amontoada" ou com dobras. Algumas colônias apresentam superfícies com áreas de zoneamentos ou com sulcos radiados e um centro elevado cônico ou convexo. O ágar é levemente penetrado pelas hifas do micélio. O reverso é negro.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são marrons, septadas e ramificadas. Os conídios (1,5 a 3 × 2,5 a 6 μm) são também escuros e de formato variado. Existem, nesta espécie, os três tipos de conidiação. Todavia, a proporção de cada uma delas está na dependência da cepa e do meio de cultivo. O *tipo Cladosporium*, frequentemente, predomina sobre o tipo *Rhinocladiella* e o tipo *Phialophora* está presente só ocasionalmente. O tipo *Cladosporium* apresenta conidióforos de comprimento variável, eretos, escuros e ramificados como "galhos de árvore". Os conídios são uni ou bicelulares, marrom-claro, ovoides, em forma de limão, elípticos, cilíndros ou irregulares. Os conídios apresentam, normalmente, duas escaras (disjuntores) escuras, resultantes da união de um conídio com o outro na cadeia ou, mais eventualmente, três escaras, quando localizados no ponto de ramificação das cadeias de esporos. Este tipo de conidiação predomina na maioria das amostras. No tipo *Rhinocladiella*, os conidióforos são dilatados, nodosos ou em forma de "taco", crescem terminalmente ou lateralmente na hifa vegetativa e dão origem a conídios unicelulares, marrons e alongados, em dentículos, em sua porção superior. Algumas vezes, o conídio primário pode produzir também, em dentículos localizados em sua área apical, conídios secundários, que, por sua vez, podem produzir conídios terciários, criando um *tipo Cladosporium* de conidiação. O tipo *Rhinocladiella* predomina em algumas amostras. No tipo *Phialophora,* as células conidiogênicas ou os conidióforos apresentam uma forma de "vaso de planta" ou "urna", com uma dilatação na extremidade em forma de um pequeno "cálice" ou colarete. Conídios elípticos são produzidos e se acumulam na extremidade do conidióforo. Esse tipo de conidiação é comumente perdida com o tempo. A conidiação é aumentada em ágar cornmeale e melhor visualizada em microcultivos.
- **Morfologia em tecido:** apesar da *F. pedrosoi* se desenvolver como hifas demáceas, septadas e ramificadas nos tecidos do hospedeiro, células denominadas

corpúsculos muriformes, marrons, arredondadas e de paredes espessas, podem ser produzidas nos tecidos subcutâneos. Os corpúsculos muriformes são característicos da cromomicose e se reproduzem por divisão, mais do que por gemulação. O processo de reprodução inclui alongamento e subsequentes septações nos eixos maior e menor da célula. A separação dos corpúsculos muriformes, normalmente, resulta em cachos de três a quatro células.

Fonsecaea compacta (Carrión) Carrión, 1940.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é lenta, atingindo a maturidade em 28 dias. A colônia produz uma superfície "quebradiça", elevada e com dobras, verde-oliva escuro a negra e com bordos denticulados. Depois de 3 a 4 semanas, hifas amarronzadas surgem na superfície da colônia. O reverso é negro.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são marrons, septadas e ramificadas, os conidióforos do tipo *Cladosporium* produzem conídios (1,5 a 3 μm) em forma de barril, com largo septo interconidial, em cadeias ramificadas e em massas subglobosas ou ovoides. A conidiação é semelhante à da *F. pedrosoi*, exceto pela forma mais compacta das cabeças conidiais, formatos menos elípticos dos conídios e cadeias menos dissociáveis. Os tipos *Rhinicladiella* e *Phialophora*podem podem ser encontrados.
- **Morfologia em tecido:** corpúsculos muriformes.

Phialophora verrucosa Medlar, 1915.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é lenta, atingindo a maturidade em 14 dias. Cresce em ágar de Sabouraud dextrosado (SDA) ou ágar malte, a 30 °C, 37 °C e a 45 °C. A superfície é verde-oliva escuro a negra, inicialmente convexa, tornando-se achatada com o tempo. Algumas amostras são lisas a radialmente dobradas. Um micélio aéreo cinza, eventualmente, cobre a colônia, que é compacta, consistente e dura. Áreas de zoneamento podem ser observadas. Em ágar cornmeal, o crescimento é limitado, mas a conidiação é incrementada. O reverso é escuro.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são marrons, septadas e ramificadas; produzem típicas células conidiogênicas (fiálides) em forma de "frasco" ou "vaso" com colarete, em forma de "taça". As fiálides são formadas lateralmente ou na extremidade da hifa vegetativa; têm 3 a 4 μm de largura e 4 a 7 μm de comprimento. Elas aparecem isoladamente ou em cachos, com ou sem haste. A esporulação ocorre semiendogenamente, na base do colarete. Os conídios (1 a 3 × 2 a 4 μm) são elípticos, pequenos, de paredes finas, produzidos em sucessão, mas não em cadeia. Envolvidos por material adesivo, acumulam-se no topo da fiálide, formando uma grande "bola de esporos". Cada conídio, ao ser liberado da fiálide, deixa um resíduo de material de parede celular em torno do colarete. Assim, as fiálides maduras, que já produziram muitos conídios, têm um colarete aumentado e de coloração marrom-escuro. Em microcultivos em ágar cornmeal, a *P. verrucosa* pode produzir algumas células conidiogênicas dos tipos *Cladosporium* e *Rhinocladiella*, de forma semelhante à *F. pedrosoi*.
- **Morfologia em tecido:** corpúsculos muriformes.

Cladophialophora carrionii Trejos, 1954.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é lenta, atingindo a maturidade em 21 dias. O organismo cresce a 30 °C e 37 °C, em SDA. A colônia é compacta, alcançando 3 a 4 cm, em 4 semanas. A superfície é plana e suavemente elevada no centro, coberta com um pequeno micélio aéreo marrom-violáceo, cinza-claro, cinza-oliváceo escuro ou negro, que dá um aspecto velutino. As margens da colônia são formadas por micélio submerso de coloração negra. O ágar malte e o ágar batata dextrosado (BDA) são meios adequados para suportar o crescimento do fungo. O reverso é escuro.
- **Morfologia microscópica:** somente a conidiação do tipo *Cladosporium* é regularmente encontrada. Longas cadeias flexuosas e ramificadas de conídios são produzidas em conidióforos bem definidos ou na extremidade da hifa vegetativa. Os conídios (1,5 a 3 × 2 a 7,5 μm) são escuros, ovais ou com forma de limão. Alguns conídios dentro da cadeia, tanto em posição intercalar quanto terminal, convertem-se em fiálides, pela dissolução da parede em sua parte superior, formando um colarete. Conídios passam, então, a ser produzidos dentro das fiálides. Esses conídios são hialinos, subglobosos a elípticos, com 1,5 × 2 μm de largura e 2 a 3 μm de comprimento, e se acumulam na extremidade da fiálide, como "bolas de esporos".
- **Morfologia em tecido:** corpúsculos muriformes.

Rhinocladiella aquaspersa (Borelli) Shell, McGinnis et Borelli, 1983.

- **Morfologia macroscópica:** crescem moderada a rapidamente em ágar. A superfície é cinza-oliváceo escuro e flocosa. O reverso é negro.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são demáceas, septadas e ramificadas. Os conidióforos são de paredes espessas, bem definidos, marrom-escuro, eretos, e dão origem a conídios somente em sua porção superior e em direção à extremidade. Os conídios (2 × 5 μm) são elípticos a claviformes, marrom-claro e unicelulares ou, ocasionalmente, bicelulares. Células fialídicas com conídios unicelulares, formando "bolas de esporos" no ápice, podem ser também encontradas.
- **Morfologia em tecido:** corpúsculos muriformes.

Diagnóstico diferencial

A cromoblastomicose deve ser diferenciada de micetoma, esporotricose, granuloma de Majochi, paracoccidioidomicose, coccidioidomicose, blastomicose, feohifomicose subcutânea, *tinea corporis*, leishmaniose, tuberculose verrucosa, sífilis terciária, nocardiose, linfostase verrucosa, sarcoidose, verrugas viais, carcinoma espinocelular e psoríases.

Prognóstico e tratamento

A doença é benigna, não colocando em risco a vida dos indivíduos acometidos, já que disseminações a sistemas e órgãos internos não ocorrem. A cromoblastomicose é de evolução crônica e insidiosa, apesentando um desenvolvimento consideravelmente lento. O *C. carrionii* é o organismo fúngico que apresenta a melhor resposta ao tratamento. Dependendo da extensão das lesões, a doença pode levar à invalidez funcional. Não existe um protocolo padrão para o tratamento da cromoblastomicose, variando a abordagem terapêutica com a espécie envolvida, intensidade lesional, infecção bacteriana secundária e resposta imunológica do paciente. A cirurgia, iodeto de potássio, vitamina D, isoniazida, 5-fluorocitosina, tiabendazol, cetoconazol, itraconazol, miconazol, posacoanzol, ravocuonazol e voriconazol, terbinafina são algumas das opções propedêuticas disponíveis.

DERMATOFITOSES (*TINEAS*)

Etiologia e epidemiologia

Dermatofitoses ou *tineas* são um conjunto de infecções que acometem o tecido queratinizado do hospedeiro humano e animal. Normalmente, esses processos ficam restritos à pele, pelos e unhas, não invadindo sítios mais profundos, e as manifestações clínicas são decorrentes da resposta irritativa do organismo aos produtos do metabolismo fúngico. Os agentes causais são, coletivamente, designados como dermatófitos. Esse termo é uma denominação não taxonômica que compreende membros de três gêneros assexuados ou anamórficos: *Microsporum, Trichophyton e Epidermophyton*. Esses fungos são altamente especializados e compõem um grupo bastante homogêneo, com forte identidade morfológica, fisiológica e antigênica. A micromorfologia em fase sapróbia ou em cultura é caracterizada pela presença de hifas septadas, hialinas e ramificadas, com produção de macro e microconídios. Nos tecidos, a morfologia é composta por hifas septadas, hialinas e ramificadas e artrósporos. O estado sexuado ou teleomórfico de alguns desses microganismos é conhecido como *Arthroderma* (Família Arthrodermataceae, Filo Ascomycota). Atualmente, cerca de 36 espécies são aceitas nos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* e em torno de 23 são reconhecidas no gênero *Arthroderm*a. De acordo com o seu hábitat, essas espécies podem ser divididas em geofílicas, zoofílicas ou antropofílicas. Aqueles dermatófitos que se desenvolvem às expensas da queratina encontrada no solo e que é proveniente da liberação natural de pele, pelos e unhas e matéria orgânica em decomposição são classificados como geofílicos. As espécies que se desenvolvem sobre a queratina viva dos hospedeiros animal e humano são classificadas em zoofílicas e antropofílicas, respectivamente. Apesar dessa especialização, membros dos três grupos podem causar infecção superficial. No entanto, a maioria das espécies geofílicas não apresenta poder patogênico e não é encontrada produzindo doença. As dermatofitoses são de ocorrência mundial, mas algumas espécies são esporádicas ou geograficamente limitadas e endêmicas, enquanto outras são cosmopolitas. O contágio é um fenômeno frequente, acontecendo por contato direto entre indivíduos saudáveis e enfermos humanos e/ou animais (zoonoses) ou indiretamente, a partir de solo e objetos ou fômites contaminados.

Clínica e patologia

A história natural das dermatofitoses tem início quando um elemento infectante (macro e microconídios, artrósporos ou hifas) entra em contato com uma estrutura queratinizada do hospedeiro. Os elementos fúngicos se desenvolvem no extrato córneo (hifas e artrósporos) e no fio de cabelo (artrósporos), em sua parte interna ou medula (parasitismo endotrix) e/ou em sua parte externa ou cutícula (parasitismo ectotrix), após penetração pelo folículo piloso (franja de Adamson). O fungo cresce de maneira radial e centrífuga na pele e pode acometer novos pelos. O processo inflamatório ocorre pela sensibilização da derme pelas enzimas proteolíticas (queratinases, elastases, colagenases) e outras substâncias produzidas pelos dermatófitos sobre a epiderme. Ao se difundir, os metabólitos atingem a derme vascularizada, que é potencialmente capaz de responder à agressão fúngica. A intensidade das lesões depende dessa resposta imunológica, bem como do sítio de infecção e do hábitat natural dos fungos. Com frequência, regiões do corpo cobertas por pelos e o parasitismo por dermatófitos zoofílicos determinam um maior grau de inflamação e exuberância lesional. Tipicamente, são observadas lesões cutâneas anelares com bordos elevados, eritematosas, descamativas e pruriginosas (impigens) e ruptura de pelos por enfraquecimento (alopécia) ou processos subcorneais e foliculares altamente inflamados e supurativos (*Kerion di Celsi*). De maneira geral, o centro das lesões anelares e as extremidades livres dos fios de cabelo não contêm os agentes causais. As áreas centrais das lesões impiginosas, por serem mais inflamadas, dificultam o desenvolvimento do patógeno fúngico, que tende a migrar para áreas com menor reação inflamatória, como as bordas da lesão. No caso das lesões em pelos, o foco da infecção está restrito ao bulbo piloso. Síndromes clínicas bem definidas, classificadas de acordo com seus aspectos fisiopatológicos e sua localização anatômica e que podem ter uma mesma etiologia e/ou etiologia variada caracterizam as dermatofitoses. Os quadros mórbidos desencadeados por membros dos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* são designados como *tinea capitis, tinea favosa, tinea barbae, tinea corporis, tinea faciei, tinea imbricata, tinea cruris, tinea manuum, tinea pedis* e *tinea unguium*.

- ***Tinea Capitis:*** a infecção do couro cabeludo é denominada *tinea capitis*. Normalmente, esse processo é causado

por *Microsporum* sp. (*tinea* microspórica ou microsporíases) e *Trichophyton* sp. (*tinea* tricofítica) e acomete com maior frequência crianças em idade escolar que adquirem a infecção a partir do contato com pessoas ou animais doentes. A doença do couro cabeludo desencadeada por *Microsporum* sp. tende à cura espontânea, quando o paciente atinge a fase de puberdade, e aquelas determinadas por *Trichophyton* sp. persistem nesse período. Clinicamente, as infecções causadas por espécies antropofílicas de *Microsporum* (*Microsporum audouinii* e *Microsporum ferrugineum*) se caracterizam pela formação de discretas placas cinza arredondadas, descamativas e eritematosas com parasitismo ectorix de todos os pelos, que se rompem a 5 a 10 mm acima da superfície cutânea (alopécia parcial), mínimo prurido e pequena reação inflamatória. Apesar da natureza benigna desses processos, ocasionalmente, ulcerações e *kerion* podem ocorrer. Microsporíases por dermatófitos zoofílicos (*Microsporum canis e Microsporum equinum*) ou geofílicos (*Microsporum gypseum*), ao contrário, cursam frequentemente com forte reação inflamatória e *kerion*. As *tineas* tricofíticas por espécies antropofílicas (*Trichophyton tonsurans, Trichophyton violaceum* e *Trichophyton soudanense*) apresentam lesões pequenas, angulares, raramente inflamatórias e com reduzido número de pelos parasitados. Esse parasitismo pilar pode ser endotrix e/ou ectotrix e, comumente, os fios de cabelo se rompem logo abaixo da superfície da epiderme (alopécia), o que confere um aspecto de pontos negros à lesão. Uma disposição multifocal das várias lesões pode ser observada. A infecção por membros zoofílicos do gênero *Trichophyton* (*Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton verrucosum*) também determina processos clínicos mais exuberantes, com placas escamosas, abscessos, pústulas foliculares, crostas, alopécia permanente e múltiplas formações de *kerion* e eritema nodoso ou eritema multiforme no couro cabeludo. Mal-estar e adenopatias regionais podem estar presentes. Diferentemente das microsporíases, essas infecções são crônicas, recorrentes, de tratamento difícil e persistem até a vida adulta.

- ***Tinea Favosa:*** a infecção é causada pelo *Trichophyton schoenleinii* e compromete, principalmente, o couro cabeludo, mas pele glabra e unhas também podem ser acometidas. Esse processo se caracteriza por uma evolução crônica com formação de crostas côncavas de coloração amarelada em torno do folículo piloso e reação inflamatória. Essas crostas são denominadas escútulas e são constituídas por aglomerados de hifas e elementos teciduais. Inicialmente, o pelo infectado mantém sua integridade, no entanto, a foliculite que se segue tende a destruir completamente a matriz do pelo, determinando uma alopécia cicatricial. As escútulas de pele glabra podem se apresentar com seu aspecto típico ou em forma de placas escamosas com inflamação e erosão tecidual. Aquelas que comprometem as unhas produzem espessamento e fragilidade da lâmina ungueal, bem como crostas de coloração também amarelada. Um odor fétido pode estar presente.
- ***Tinea Barbae:*** os pelos da barba podem ser também parasitados por espécies de *Microsporum* e *Trichophyton*. Normalmente, as lesões são superficiais e de intensidade moderada. No entanto, lesões altamente inflamadas, eritematosas, pústulo-vesiculares e foliculares da face e pescoço podem ser causadas por *Trichophyton* sp. zoofílico (*T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* e *T. verrucosum*).
- ***Tinea Corporis:*** a infecção da pele glabra do tronco e membros, com exceção de mãos e pés, é denominada *tinea corporis*. O processo está confinado ao extrato córneo da epiderme e, tipicamente, suas lesões se caracterizam por apresentarem um aspecto arredondado com um bordo eritemato-escamoso ou vesicular com prurido e espelhamento excêntrico (impigem). Lesões simples, múltiplas ou confluentes, causadas por dermatófitos antropofílicos como *Epidermophyton foccosum, T. mentagrophytes* var. *interdigitalis*, *Trichophyton rubrume Trichophyton tonsurans* são comumente encontradas. Com frequência, curas espontâneas com ou sem recidivas podem ocorrer. Uma lesão inflamada de moderada intensidade e marcada pela presença de *kerion* pode estar presente, quando o agente etiológico for um dermatófito zoofílico (*M. canis* e *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*). Eventualmente, a infecção do folículo piloso por *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, após a depilação, pode determinar uma reação inflamatória semelhante àquela observada no couro cabeludo, com lesões pápulo-pustulares, circunscritas, elevadas e crostosas, denominadas *Granuloma de Majocchi*.
- ***Tinea Faciei:*** a infecção da pele do rosto e do queixo de crianças e mulheres é chamada de *tinea faciei*. Lesões circulares, descamativas, eritematosas, com bordas elevadas, pápulas e pústulas, prurido ou sensação de queimação são comuns. O *T. rubrum* é o dermatófito mais frequente, entretanto, infecções por *T. mentagrophytes*, *T. violaceum*, *M. canis* e *E. floccosum* são também descritas.
- ***Tinea Imbricata:*** esse processo é uma derivação da *tinea corporis* e se caracteriza pela formação de lesões pápulo-escamosas de bordos elevados, dispostas como círculos concêntricos por toda a superfície corporal que, inicialmente, podem ser descamativas e pruriginosas, mas que, ao cronificar, produzem pouca irritação ou mal-estar. O agente etiológico dessa condição clínica é o *Trichophyton concentricum*, que é mais prevalente entre os polinésios.
- ***Tinea Cruris:*** a infecção da região inguinal é denominada *tinea cruris*. A maceração e a oclusão da pele dessa região, além da umidade e temperatura elevadas, favorem a implantação e o desenvolvimento dos patógenos fúngicos. A doença é mais comum em indivíduos adultos de sexo masculino e seu contágio é, usualmente, indireto, por meio de fômites contaminados. O surgimento na face inguinal interna de placas eritemato-escamosas, serpiginosas, bordos elevados e bem delimitados, vesículas ou vesículo-pústulas, pequenos abscessos, prurido e queimação caracterizam a lesão. A infecção tende ao espalhamento e normalmente a região pubiana, o pênis e saco escrotal, períneo, as nádegas e o abdome inferior

são acometidos. Infecções secundárias de tórax, axilas, membros e espaços interdigitais de mãos e pés podem ocorrer. *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* e *E. floccosum* são as espécies mais isoladas em *tinea cruris*.

- ***Tinea Manuum:*** a infecção das mãos é conhecida como *tinea manuum*. A princípio, a infecção é unilateral, no entanto, ambas as mãos podem ser comprometidas. O agente mais frequente é o *T. rubrum*. Outros dermatófitos isolados, contudo, são *T. tonsurans, T. mentagrophytes var. interdigitalis e E. floccosum*. Em geral, *T. rubrum* e *T. tonsurans* produzem lesões de evolução crônica, secas e escamosas, com vesículas, eritema e hiperqueratose na palma das mãos e lateral dos quirodáctilos. Lesões palmares agudas, úmidas, vesiculares e eczematosas, com odor fétido e sensação de queimação, são observadas com frequência em infecções por *T. mentagrophytes*. *Trichophyton rubrum* tem sido também isolado de lesões papulares, eritematosas e pouco escamosas do dorso das mãos.
- ***Tinea Pedis:*** o comprometimento de planta dos pés e espaço interdigital é denominado *tinea pedis*. Normalmente, os dois pés são acometidos, no entanto, lesões unilaterais podem também ocorrer. A manifestação clínica mais comum é a forma intertriginosa que se caracteriza pela presença de lesões agudas e crônicas da pele dos espaços interdigitais com descamação, maceração, fissuras e eritema, bem como prurido e queimação. De maneira típica, o espaço entre o quarto e o quinto pododáctilo é acometido. O espalhamento para outras áreas adjacentes, incluindo unhas, também é comum. Outra forma observada é a hiperqueratose crônica, caracterizada por áreas eritemato-escamosas secas que acometem a região do calcanhar, da planta e da lateral dos pés (lesão do tipo mocacim). Um terceiro tipo são as lesões agudas inflamadas, acompanhadas da formação de vesículas, pústulas e/ou bolhas que contêm um exsudato claro e estão distribuídas pelo dorso e pela planta dos pés e pelo espaço interdigital. As formas vesiculares podem resolver espontaneamente, mas recidivas são comuns. O agente mais isolado é o *T. rubrum*, seguido pelo *T.mentagrophytes* var. *interdigitalis* e *E. floccosum*.
- ***Tinea Unguium:*** a infecção uni ou bilateral das unhas dos quirodáctilos e pododáctilo é chamada de *tinea unguium*. As unhas dos pés são acometidas com maior frequência, sendo a infecção normalmente secundária à *tinea pedis.* Em geral, a *tinea unguium* das mãos é decorrente de *tinea capitis, tinea corporis* ou *tinea manuum*. As lesões podem estar limitadas a uma ou duas unhas ou comprometer a totalidade dessas estruturas. Contudo, as unhas do primeiro e do quinto pododáctilo são, classicamente, as mais afetadas. Leuconíquia micótica e infecção invasiva subungueal são os principais tipos clínicos. A leuconíquia micótica é caracterizada pela presença de placas superficiais de coloração branca, contornos irregulares e bordas demarcadas, circunscritas ou progressivas que, normalmente, se desenvolvem a partir da extremidade livre da unha. O *T. mentagrophytes* é responsável pela maioria dos casos de leuconíquia micótica. A doença invasiva pode ter início distal, proximal ou lateral e ser precedida por uma paroníquia menor. Placas pequenas, bem definidas e de aspecto amarelado ou esbranquiçado, que podem se manter estacionárias ou se espalhar até a base da unha, são os primeiros sintomas observados. No processo estabelecido, a lâmina ungueal se apresenta descolorada ou enegrecida, distrófica, quebradiça, friável e espessada. O acúmulo de massa ou debris subungueais (hiperqueratose) pode levar a rupturas e à separação do leito ungueal, deixando uma fina base sulcada com uma borda irregular e farinácea. A doença invasiva é causada principalmente pelo *T. rubrum*.
- ***Micetoma Dermatofítico:*** a invasão incomum do tecido subcutâneo com formação de grãos esbranquiçados a amarelados constituídos por hifas septadas e vesículas e com diâmetro de 80 a 500 μm é denominada micetoma dermatofítico. A pele afetada se mostra espessada, endurecida, descamativa e com alopécia, e tratos sinuosos drenantes podem ou não estar presentes. Essa condição é frequentemente observada no couro cabeludo, mas, com a evolução das lesões, são acometidos também pescoço e tronco. Espécies do gênero *Microsporum* são os dermatófitos mais isolados.
- ***Dermatofitides:*** o aparecimento de reações alérgicas em sítios distantes do foco primária de uma infecção por dermatófito é demoninada de dermatofitides. Pode ser observado Um quadro clínico variado com prurido, sensação de queimação, formação de vesículas e bolhas na região dos quirodáctilos e palmas das mãos, secundário à produção de metabólitos circulantes por agentes de *tinea pedis*.

Diagnóstico laboratorial

- **Exame microscópico direto:** o diagnóstico presuntivo de dermatofitose pode ser obtido a partir da observação de hifas septadas, hialinas e ramificadas e cadeias de artrósporos em escamas de pele, fragmentos de vesículas e fios de cabelo com bulbo piloso, em montagens microscópicas com KOH a 10% ou 20% e, no caso de raspados de unha, em montagens com KOH a 40%. Em *tinea capitis*, um padrão de parasitismo pilar, ectotrix e endotrix pode ser observado pela presença de artrósporos na cutícula do pelo (formação de bainha externa) ou no interior da medula do pelo. Artrósporos de pequenas dimensões (2 a 4 μm) e grandes dimensões (10 μm) são descritos. As escútulas de *tinea favosa* são constituídas por um aglomerado de hifas, células epidérmicas e polimorfonucleares e os pelos infectados apresentam hifas septadas hialinas e áreas com degeneração gasosa em seu interior. Em todos os tipos de espécimens dermatológicos podem estar presentes estruturas microscópicas que mimetizam elementos fúngicos. Glóbulos de gordura, grãos de amido, fibras de algodão e lã, detritos vegetais, materiais sintéticos e mosaico fúngico (cristais de colesterol depositados em

torno das células epidérmicas, formando uma rede) são os artefatos que devem ser diferenciados. Grânulos de pólen e elementos hifálicos ou leveduriformes de fungos contaminantes podem também ser observados nos espécimens de pele e unha.

- **Cultura:** a cultura dos espécimens clínicos deve ser sempre procedida tanto nos casos de resultado positivo do exame microscópico direto quanto naqueles em que a microscopia é inconclusiva. O isolamento de dermatófitos pode ser conseguido a partir da inoculação de amostras de pele, pelo e unhas, em meios de cultura que contenham antibacterianos e antifúngicos, para a inibição do crescimento de microrganismos contaminantes. Normalmente, ágar de Sabouraud dextrosado suplementado com cloranfenicol e cicloheximida é empregado para o isolamento primário desses fungos. A incubação das culturas deve ser feita de 25 °C a 30 °C, por um período de até 4 semanas. No entanto, em geral, uma colônia de dermatófito de aspecto filamentoso está presente em 2 semanas. Outro meio de cultura também utilizado para isolamento primário é o *dermatophytes testing medium* (DTM), que permite a identificação de dermatófitos pela produção de um pigmento avermelhado que se difunde no meio de cultura. Como os gêneros *Microsporum, Trichophyton* e *Epidermophyton* são proximamente relacionados, há fortes semelhanças entre suas morfologias microscópicas. Um micélio hialino septado e ramificado está presente em todos os dermatófitos, no entanto, a forma e quantidade de seus macro e microconídios diferem. O gênero *Microsporum* apresenta grande número de macroconídios com morfologia fusiforme, multisseptados e de paredes espessadas e menor quantidade de microconídios piriformes e unicelulares. O *Trichophyton* sp. tem pequena quantidade ou ausência de macroconídios em forma de charuto, multisseptados e com paredes delgadas, mas grande número de microconídios piriformes e unicelulares. O *E. floccosum* não produz microconídios e seus macroconídos são em forma de clava, multisseptados e produzidos em cachos no conidióforo. O desenvolvimento de estruturas microscópicas de identificação pode ser estimulado com subscultivos em meio lactrimel.

Epidermophyton floccosum (Hartz) Langeron et Milochevitch, 1930.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é moderada, atingindo a maturidade em 10 dias. Inicialmente, a colônia apresenta-se pulverulenta e branca; posteriormente, passa a apresentar uma coloração amarelo-esverdeada, amarelo-amarronzada, verde-oliva claro ou cáqui. As colônias alcaçam 3 a 3,5 cm de diâmetro, em 2 semanas, em ágar de Sabouruad dextrosado (SDA), a 30 °C. As colônias maduras mostram hifas aéreas pequenas, acinzentadas, e dobras radiais ou irregulares no centro, apresentando, por isso, um aspecto velutino. O reverso da colônia é transparente ou laranja-amarronzado, algumas vezes com uma borda amarelada.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são hialinas e septadas. Uma cultura típica produz abundantes macroconídios multicelulares (2 a 6 células) que apresentam uma base larga e uma extremidade distal arredondada (em forma de raquete ou taça) e paredes externas lisas. Os macroconídios têm de 7 a 12 × 20 a 40 μm e são asseptados ou multiseptados (4 septos) e, frequentemente, produzidos em cachos. Não são formados microconídios. Células esféricas de paredes finas podem ser produzidas nos cultivos "velhos". Hifas em espiral podem ser encontradas em certas cepas.

Microsporum Gruby, 1843.

- **Morfologia macroscópica:** os fungos desse gênero apresentam colônias com uma textura algodonosa a pulverulenta e uma coloração que varia de branco a amarelo ou marrom-escuro.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são hialinas, septadas e ramificas. Hifas em raquete, corpos pectinados, órgãos nodulares e clamidósporos são, comumente, encontrados. Macroconídos multisseptados e multicelulares (2 a 12 células) são fusiformes, medem 7 a 20 × 35 a 125 μm e, usualmente, têm paredes espiculadas ou rugosas e espessas. A rugosidade pode ser mais evidente próximo ou nas extremidades distais. Microconídios unicelulares, com 2,5 a 3,5 × 4 a 7 μm e claviformes são produzidos ao longo do micélio, em pequenos conidióforos ou diretamente sobre as hifas vegetativas (sésseis).

Microsporum audouinii Gruby, 1843.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é moderada, atingindo a maturidade em 7 a 10 dias. A colônia é plana, de coloração parda a cinza, com pequeno micélio aéreo. A textura é sedosa devido ao pequeno micélio aéreo. A margem das colônias é geralmente radiada. O reverso da colônia é, frequentemente, de cor pêssego ou salmão. Esses pigmentos são melhor revelados em ágar cornemal ou em ágar batata dextrosado (BDA).
- **Morfologia microscópica:** as hifas são hialinas, septadas e ramificadas. Clamidósporos terminais com pequena estrutura mamiliforme estão presentes e servem como um útil critério diagnóstico. Raramente produzem conídios. Contudo, ocasionalmente, alguns isolados podem produzir macroconídios claviformes característicos do gênero *Microsporum* (2 a 3 × 3 a 4 μm). Macroconídios rugosos podem lembrar aqueles encontrados no *M. canis*, mas, normalmente, são mais longos e estreitos. Hifas em raquete e corpos pectinados são observados em muitos isolados.

Microsporumcanis Bodin, 1902.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é moderada, atingindo a maturidade em 6 a 10 dias. Produzem colônias brancas a amareladas, com abundante micélio aéreo. A superfície é algodonosa ou penugenta e apresenta sulcos radiais. O reverso da colônia é amarelo-limão ou amarronzado.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são hialinas, septadas e ramificadas. Produzem abundantes macroconídios (10 a 25 × 35 a 125 μm) fusiformes com paredes espessas (até 4 μm), rugosa a espiculada. Os macroconídios comumente têm uma protuberância assimétrica terminal e a rugosidade da parede conidial é mais aparente nessa protuberância. Números septos de paredes espessas são encontrados dividindo os macroconídios em 3 a 15 células. Microconídios (2,5 a 3,5 × 4 a 7 μm) são menos números e têm formato claviforme a piriforme e são formados ao longo da hifa.

Microsporum gypseum (Bodin) Guiart et Grigorakis, 1928.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é moderada a rápida, atingindo a maturidade em sete dias. A colônia pode ser cor de "pele", canela e amarelo-amarronzado. A superfície é plana e pulverulenta, devido à produção abundante de macro e microconídios. Uma borda irregularmente frangeada pode estar presente. O reverso pode ser amarelo, laranja, vermelho-amarronzado ou vermelho-púrpura.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são hialinas, septadas e ramificadas. Produzem macroconídios multicelulares em grande número. Esses são fusiformes, largos, com 4 a 6 septos e medindo 7 a 16 × 22 a 60 μm. A parede conidial é moderadamente espessa e finamente rugosa. Filamentos em forma de "cauda de rato" podem ser vistos na extremidades dos conídios. Microconídos (2,5 a 3 × 4 a 6 μm) são claviformes e produzidos esparsamente ao longo da hifa. O número de microconídios pode aumentar em subcultivos.

Trichophyton Malmstem, 1845. O gênero *Trichophyton* se carateriza por apresentar macroscopicamente um aspecto algodonoso, granular ou pulverulento, glabroso, liso e ceroso. Os pigmentos produzidos variam grandemente e as culturas podem ser brancas, rosas, vermelhas, púrpuras ou violetas. Com subcultivos sucessivos, os pigmentos podem ser perdidos. Ao exame microscópico, os microconídios são números e vistos como pequenas estruturas unicelulares, de paredes finas, hialinos, subesféricos a claviformes, com 2 a 4 μm, formados lateralmente ao longo da hifa ou em cachos. Em geral, os microconídios são extremamente números, exceto para as espécies de crescimento lento, como *T. schoenleinii*, *T. verrucosum* e *T. violaceum*, cujos cultivos estão quase sempre desprovidos de esporulação. Muitas cepas de *Trichophyton* recuperadas em laboratório somente produzem microconídios. Os macroconídios (multicelulares), quando produzidos, estão presentes em pouca quantidade, têm a forma de charuto, são sustentados em delicados e curtos conidióforos e apresentam uma delgada parede lisa, sem evidência de rugosidade ou equinulações.

Trichophyton mentagrophytes (Robin) Blanchard, 1896.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é moderada, atingindo a maturidade em 7 a 10 dias. As colônias típicas de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (*T. mentagrophytes*) são planas, de coloração creme a amarelada, com superfície pulverulenta. A aparência pulverulenta é devido à grande quantidade de microconídios. A margem da colônia é usualmente radiada e de textura granular. Números variações ocorrem na cor da colônia e na textura superficial. O *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum* (*T. quinkeanum*) tende a produzir colônias profundamente pigmentadas e *T. mentagrophytes* var. *erinacei* (*T. erinacei*) frequentemente produz formas granulares de coloração amarelada. O *T. mentagrophytes* var. *interdigitales* (*T. interdigitalis*) produz colônias densamente penugentas, com centro creme e margem branca. Culturas "velhas" podem produzir coloração rosa. Muitos isolados são completamente brancos e com tufos. Nos subcultivos em ágar batata dextrosado (BDA), colônias com números conídios e carateristicamente pulverulentas podem ser produzidas. O grau de esporulação, que determina a textura pulverulenta, varia enormemente entre os isolados da variedade *interdigitales*. O reverso das colônias das variedades de *T. mentagrophytes* em ágar de Sabouruad dextrosado (SDA) pode ser hialino, marrom, amarelo ou vermelho-escuro. As colônias de reverso vermelho-escuro lembram aquelas de *T. rubrum*. Todavia, esse reverso vermelho não é produzido pelas variedades de *T.mentagrophytes* em ágar cornmeal com 1% de glicose. As variedades de *T. mentagrophytes* podem ser diferenciadas do *T. rubrum* pela produção de órgãos de perfuração (hifas em espiral).
- **Morfologia microscópica:** as hifas são hialinas, septadas e ramificadas. Provavelmente, o aspecto mais consistente das variedades de *T. mentagrophytes* é a produção de microconídios em cachos. Esses são mais abundantes e arredondados nos isolados zoofílicos pulverulentos e menos numerosos, menores e em forma de "gota", nas amostras antropofílicas penugentas. Nessas últimas, os macroconídios são mais claviformes e lembram aqueles do *T. rubrum*. Eles são, normalmente, septados, multicelulares (1 a 6 células), em forma de charuto ou taco, com uma base de inserção estreita. medem 6 a 8 × 20 a 50 μm e, ao contrário do *T. rubrum*, têm uma estrutura filamentosa em sua extremidade em forma de "cauda de rato". O número de macroconídios pode ser maior nas amostras zoofílicas. Os macroconídios

podem estar presentes em associação com cachos de microconídios e hifas espiraladas bem desenvolvidas. Órgãos nodulares, hifas em candelabros, hifas em raquete, clamidósporos são estruturas comuns nessa espécie.

Trichophyton rubrum (Castellani) Sabouraud, 1911.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é moderada, atingindo a maturidade em 14 dias. Os isolados típicos de *T. rubrum* produzem colônias brancas, granulares, penugentas ou com tufos e com pigmentos vermelho, vinho ou púrpura ou, ainda, alaranjado, marrom ou hialino no reverso. Esses isolados são, geralmente, desprovidos de conídios. Ocasionalmente, alguns isolados podem produzir colônias menos algodonosas e mais "amontoadas", com menor pigmentação no reverso. Esses isolados produzem abundantes macroconídios e essas colônias podem lembrar as de *T. violaceum*, que apresentam pigmento mais púrpura do que vermelho e requerem tiamina para o bom crescimento. Certos isolados produzem pigmentos melanoides esverdados. Esses isolados têm sido chamados de *T. rubrum* var. *nigricam*. O ágar batata dextrosado (BDA) ou ágar cornmeal são superiores para a produção de pigmentos.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são hialinas, septadas e ramificadas. Os isolados típicos, normalmente, não produzem macroconídios, mas produzem microconídios (2 a 3 × 3 a 5 μm) pequenos, piriformes e em forma de gota lateralmente na hifa. Cachos de conídios em arranjo arborescente são vistos. Em isolados muito esporulantes, macroconídios podem ser abundantemente produzidos no topo de uma hifa espessa ou em cachos diretamente na hifa vegetativa, mas também podem ser raros ou ausentes. Os macroconídios (4 a 6 × 15 a 30 μm) são septados, estreitos e longos (lembrando um "lápis"), de paredes finas e paralelas, com 2 a 8 células, e formados diretamente na parte final de hifas espessas, em grupos ou isoladamente. Os microconídios nos isolados esporulantes tendem a ser maiores, clavifromes e, frequentemente, são produzidos diretamente ao longo da porção inferior dos macroconídios ou em cachos na hifa. Macroconídios, em alguns isolados, podem se fragmentar e formar artrósporos, clamidósporos e corpos pectinados. Os isolados de formas esporulantes de *T. rubrum* podem ser distinguídos dos de *T. tonsurans* e *T. mentagrophytes*, pela observação dos microconídios produzidos diretamente ao lado de longos e estreitos macroconídios.

Trichophyton schoenleinii (Lebert) Langeron et Milochevitch, 1950.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é lenta, atingindo a maturidade em 15 dias. As colônias são glabrosas, sedosas ou acamurçadas. Exibem uma coloração branca ou acinzentada, têm centro elevado e irregularmente dobrado, podendo apresentar muitas circunvoluções. A margem da cônia consiste de micélio submerso. Podem penetrar no ágar, levantando-o ou produzindo rachaduras e trincas. Isolados frescos podem produzir colônias leveduriformes, que se tonam mais miceliais e penugentas quando mantidas em meios artificiais por longo tempo. Crescem bem a 37 °C. O reverso é hialino, amarelo-alaranjado ou bege.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são hialinas, septadas e ramificadas. Macro e microconídios não são produzidos. Ramificações terminais das hifas carateristicamente conhecidas como candelabros fávicos são encontrados no micélio submerso. Essas estruturas são vistas em outros dermatófitos de crescimento lento, mas as dilatações em forma de "cabeça de prego" são caraterísticas do *T. schoenleinii*. Algumas microconídios claviformes distorcidos são observados em alguns isolados, particularmente, quando os organismos crescem em grãos de arroz. Macroconídios nunca são vistos, mesmo em meios ricos. Alguns isolados leveduriformes recentes podem produzir artrósporos esféricos. Clamidósporos são númerosos. O *T. schoenlenii* pode ser diferenciado do *T. verrucosum*, do *T. violaceum* e do *T. concentricum* pelo bom crescimento a 37 °C e não requerimento de tiamina.

Trichophyton tonsurans Malmsten, 1845.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é moderada a lenta, atingindo a maturidade em 12 dias. As colônias podem ser brancas, cinzas, bege, amarelas ou marrom-avermelhadas, rosas com superfície crateriforme, cerebriforme, lisa ou penugenta ou, ainda, acamurçadas com muitas dobras radiais ou concêntricas. O reverso da colônia é mais frequentemente marrom-avermelhado; algumas vezes, porém, pode ser amarelo ou vermelho. O pigmento produzido pode se difundir no meio. O *T. tonsurans,* diferentemente do *T. rubrum*, não produz uma coloração intensa em ágar cornmeal ou ágar batata dextrosado (BDA). O crescimento é mínimo ou ausente em meios livres de tiamina, uma caraterística que difere do *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. A histidina é requerida para o crescimento de *T. mentagrophytes* e não para *T. tonsurans*.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são hialinas, septadas e ramificadas. Os microconídios variam no tamanho e forma, mas, usualmente, são abundantes. Todavia, em sua maioria, medem 2 a 5 × 3 a 7 μm e são claviformes, piriformes ou em forma de gotas. Frequentemente, são produzidos lateralmente em hifas indiferenciadas ou em pequenos e simples conidióforos. Um aspecto característico é o entumescimento de alguns microconídios que

apresentam uma forma de balão. Microconídios filiformes, produzidos lateralmente em hifas terminais espessadas, lembram uma centopeia. Macroconídios de paredes espessas ocorrem menos frequentemente e são irregulares em sua forma. São encontrados Clamidósporos, micélio em raquete e em espiral e estruturas semelhantes a artrósporos. O *T. tonsurans* têm parcial requerimento para tiamina.

- **Provas fisiológicas:** essas provas podem ser empregadas quando a identificação dos dermatófitos não puder ser feita pela análise micromorfológica em meios de cultura de uso corrente. Muitos dermatófitos demonstram requerimentos nutricionais distintos que podem ser utilizados para sua identificação. Meios desidratados estão disponíveis comercialmente para esses testes. Um conjuto de meios de cultura (ágar *Trichophyton*), contendo um meio básico com caseína e outros meios com diferentes composições e arranjos nutricionais (caseína, inositol, tiamina, ácido nicotínico, nitrato de amônia e histidina), pode ser empregado para a identificação de espécies do gênero *Trichophyton*, entre elas *Trichophyton megninii, T. schoenleinii, T. verrucosum* e *T. violaceum*. A diferenciação entre *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* pode ser procedida em ágar ureia de Christensen, pela mudança da cor incial do meio para vermelho. Normalmente, as amostras de *T. mentagrophytes* são positivas e a cor vermelha indica a produção de urease. A produção de pigmentos hidrossolúveis cor de vinho em ágar batata dextrosado (BDA) pelo *T. rubrum* também permite a separação com o *T. mentagrophytes*. Essas duas espécies podem ser ainda diferenciadas pela prova da perfuração em pelo. Fragmentos de fios de cabelo autoclavados em tubo de ensaio são inoculados com a amostra sob investigação. A ocorrência de perfurações cônicas tranversais no pelo é positivo para *T. mentagrophytes.* Provas fisiológicas podem ser igualmente empregadas para a diferenciação de *M. canis* e *M. audouinii*, *T. mentagrophytes* e *Microsporum persicolor* e *T. soudanense* e *Microsporum ferrugineum*.

Diagnóstico diferencial

Os processos patológicos também a considerar são: ***Tinea Capitis:*** alopécia areata, dermatite seborreica, impetigo, piodermа, psoríase, sífilis secundária e tricotilomania; ***Tinea Barbae:*** acne, actinomicose, alopécia areata, dermatite seborreica, epitelioma, infecção estafilococócica (carbúnculo, foliculite), queratoacantoma e sífilis pustular; ***Tinea Corporis:*** dermamatite de contato, dermatite seborreica, eczema, impetigo, lúpus eritematoso, pitiríase rósea, pitiríase versicolor, psoríase e sífilis secundária e terciária; ***Tinea Faciei:*** dermatite de contato, dermatite seborreica, impetigo, lúpus eritematoso, psoríase; ***Tinea Cruris:*** candidíase inguinal, dermatite de contato, dermatite seborreica, eritrasma, psoríase, intertrigo bacteriano e líquen plano; ***Tinea Manuum:*** candidíase superficial, dermatite de contato, psoríase e sífilis secundária; ***Tinea Pedis:*** candidíase superficial, intertrigo bacterino, dermatite de contato, eczema, queratoderma idiopático, psoríase, sífilis secundária, desidrose e erupções iatrogênicas; ***Tinea Unguium:*** alterações não infecciosas, eczema, líquem plano, onicomicose por *Candida* e outros fungos (*Scopulariopsis* sp., *Scytalidium* sp.) e bacteriana (*Pseudomonas aeruginosa*), paroníquia e psoríase; ***Dermatofitides:*** dermatite de contato.

Prognóstico e tratamento

A terapia antifúngica oral e/ou tópica é utilizada para tratamento das diversas formas de dermatofitose. Derivados azólicos (bifonazol, cetoconazol, clotrimazol, econazol, fluconazol, isoconazol, itraconazol, miconazol e tioconazol), terbinafina, ciclopiroxolamina, amorolfina, tolnaftato, tolciclato, griseofulvina, corticoesteroides, agente queratinolíticos e antibióticos para infecções bacterianas secundárias podem ser empregados. A retirada cirúrgica da unha pode ser também requerida.

Em geral, o prognóstico das dermatofitoses é bom. No entanto, diferenças de comportamente são observadas: ***Tinea Capitis:*** algumas formas tendem à cura espontânea e outras tendem à cronicidade. Alopécia e cicatrizes são as principais sequelas; ***Tinea Barbae:*** curas espontâneas podem ocorrer, mas lesões não tratadas também podem apresentar como sequelas alopécia e cicatrizes; ***Tinea Corporis:*** as lesões podem resolver sem tratamento, mas infecções repetidas são comuns; ***Tinea Faciei:*** curas espontâneas são frequentes; ***Tinea Cruris:*** o prognóstico é bom com tratamento; ***Tinea Unguium:*** a resolução espontânea é rara e os fracassos terapêuticos são a regra; ***Tinea Pedis:*** recorrência e reinfecções são observadas com frequência e ***Tinea Manuum:*** as lesões podem resolver de maneira espontânea, mas, comumente, ocorrem infecções repetidas.

ESPOROTRICOSE

Etiologia e epidemiologia

A esporotricose é um processo subagudo ou crônico que compromete principalmente o tecido cutâneo, subscutâneo e linfático, produzindo lesões nodulares de aspecto verrucoso, que supuram e ulceram. Os agentes causais dessa micose formam um grupo fúngico denominado complexo *Sporothrix schenckii* (*S. schenkii lato sensu*) que é constituído pelas seguintes espécies crípticas: *Sporothrix albicans (anteriormente Sporothrix pallida)*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix mexicana* e *Sporothrix schenckiisensu stricto.* As espécies desse complexo são dimórficas e apresentam uma fase filamentosa em vida livre e uma fase leveduriforme nos tecidos. Com base no *S. schenckii lato sensu*, a morfologia em vida livre é caracterizada pela presença de hifas (1 a 2 μm) septadas, hialinas e ramificadas, além de conídios elípticos (2 a 4 × 3 a 5 μm) e triangulares. No estado parasitário, se apresenta como células de levedura (1 a 2 × 7 a 9 μm) pequenas e largas, em forma de charuto ou naveta e com um único

brotamento em um dos polos. Classicamente, tem-se considerado que a fase teleomórfica do gênero *Sporothrix* está em *Ceratocystis* sp. (Filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Microascales), no entanto, alguns estudos têm sugerido que *Ophiostoma* sp. (Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Ophiostomatales) seja também um teleomorfo do gênero *Sporothrix*. O hábitat natural desse grupo de fungos parece ser solo e vegetais em decomposição. Normalmente, ambientes com temperatura entre 26 °C e 27 °C e humidade relativa de 92% a 100% favorecem o desenvolvimento sapróbio desse microganismo. A esporotricose é de distribuição universal, sendo mais encontrada em áreas tropicais e temperadas. No entanto, a maioria dos casos tem sido relatada na América do Norte, México e América Central, Colômbia e Brasil. A infecção é prevalente entre os indivíduos que manipulam plantas ou material de natureza vegetal. Dessa forma, carpinteiros, empalhadores, agricultores, jardineiros e floricultores são frequentemente acometidos. Diferenças entre sexo, idade e raça não têm sido descritas. No entanto, a predominância de um ou outro grupo está associada à exposição a fontes de infecção e/ou a áreas de endemicidade. Além do tamanho da carga infectante, o grau de desnutrição e o comprometimento imunológico são importantes fatores predisponentes para a esporotricose disseminada, que é considerada uma doença oportunista. Tipicamente, a forma cutânea localizada afeta pacientes em bom estado de higidez e com idade inferior a 30 anos, bem como crianças. Em Medicina Veterinária, os animais mais acometidos são gatos, cães e cavalos.

Clínica e patologia

Em geral, a esporotricose é decorrente da implantação traumática de elementos infectantes do complexo *Sporothhrix schenckii* no sistema tegumentar. Menos frequentemente, o fungo pode atingir os tecidos do hospedeiro pela via pulmonar. O espalhamento da doença pode ocorrer por disseminações hematogênicas ou linfáticas. Uma forma cutânea (linfocutânea e dermo-epidérmica), uma extracutânea (disseminada) e outra pulmonar são os principais tipos clínicos observados. Após um período de poucos dias ou alguns meses, surge, no síto de implantação, na pele (face, tronco ou membros), uma pápula consistente, indolor e móvel. Posteriormente, essa lesão papular se infiltra, forma um nódulo e passa a apresentar uma coloração púrpura. Na sequência, os nódulos necrosam e produzem uma lesão primária denominada cancro esporotricótico ou esporotricoma. São formadas em seguida úlceras de fundo avermelhado e granulomatoso e bordos irregulares, que drenam uma secreção serosa ou purulenta. Edemas, crostas sero-hemáticas e nódulos satélites surgem em torno dessas lesões ulceradas. Adenopatias locais ou regionais acompanham a evolução clínica do processo. Algumas vezes, pequenas úlceras constituem a lesão primária, ao invés de pápulas ou nódulos, demonstrando uma natureza cutânea das lesões mais do que subcutânea. A histopatologia dessas úlceras permite a visualização de células de leveduras e elementos hifálicos que não são encontrados em áreas mais profundas. O tronco linfático adjacente é também secundariamente comprometido, tornando-se endurecido e com nódulos e úlceras drenantes em seu trajeto, até o linfonodo regional (linfangite nodular ascendente). De maneira esporádica, essa forma linfocutânea da doença pode resolver-se espontaneamente, contudo, o mais comum é a cronicidade. A esporotricose que acomete pacientes sensibilizados de áreas endêmicas pode apresentar um comportamento lesional particular, com placas verrucosas e/ou acneiformes, de bordos elevados e violáceas, eritema papular ou macular e úlceras que se mantêm no local da lesão e não atingem os vasos linfáticos. Classicamente, essa forma localizada e de evolução crônica, que acomete face, pescoço, tronco, braços e mãos, é conhecida como esporotricose dermo-epidérmica. A manifestação mais comum da doença extracutânea e disseminada, que se segue às lesões cutâneas, é a esporotricose osteoarticular (osteomielite, artrite, tenossinovites e periosteítes). Essa forma compromete, principalmente, os ossos das mãos, pés e joelhos, cursando com dor, limitação funcional, tumefação, rubor e calor e derrame articular serossanguinolento. Ocasionalmente, os pulmões podem ser acometidos após inalação de conídios do complexo *S. schenckii* ou em decorrência de disseminação hematogênica, nas formas multifocais de esporotricose, o que é incomum. A doença pulmonar pode apresentar uma evolução levemente aguda ou crônica, progressiva e fatal. No entanto, há relatos, na literatura de cura espontânea. Os sintomas são inespecíficos e incluem tosse, expectoração produtiva, febre, perda de peso, astenia, dor torácica, derrame pleural e hemoptise. Os achados radiológicos comprovam a presença de lesões infiltrativas ou nodulares (localizados ou miliares) biapicais ou pericavitárias, cavidades de paredes finas, adenomegalia hilo-mediastinal e fibrose. Outros sítios anatômicos, como sistema nervoso central, córnea e globo ocular e seios nasais podem ser também comprometidos, em consequência da inoculação traumática ou disseminação vascular do complexo *S. schenckii*.

Diagnóstico laboratorial

- **Exame direto e histopatologia:** como os elementos leveduriformes do complexo *S. schenckii* estão, em geral, presentes em pequenas quantidades nos tecidos, o exame direto e as colorações teciduais pela hematoxilina e eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS) e Gromori-Grocott (prata), calcoflúor branco, além do Gram e Giemsa, são pouco úteis para o diagnóstico presuntivo de esporotricose. Todavia, quando detectadas, as leveduras do complexo *S. schenckii* apresentam uma forma ovoide ou de charuto com gemulação polar. Em lesões superficiais, fragmentos de hifas podem estar também presentes. Algumas vezes, podem ser encontradas estruturas teciduais conhecidas como corpos asteroides. Tipicamente, essas estruturas se formam em torno do agente fúngico, produzindo uma bainha eosinofílica radiada, sendo decorrentes da deposição de imunoglobulinas.
- **Cultura:** o diagnóstico definitivo de esporotricose é obtido por isolamento a partir dos espécimens clínicos e pela identificação do complexo *S. schenckii*. O fungo

cresce bem em meios como ágar de Sabouraud dextrosado (SDA), ágar BHIA e ágar sangue, à temperatura de 24 °C a 28 °C. Além disso, por ser resistente a antibióticos e cicloheximida, o ágar mycosel ou micobiótico também pode ser empregado. A taxa de isolamento é alta e, normalmente, uma colônia filamentosa está presente em 3 a 5 dias. A indução da formação de micélio e conidiação pode ser feita com o uso de ágar milho ou ágar malte. O diagnóstico de esprotricose é concluído com a obtenção da fase leveduriforme do fungo em ágar BHIA ou ágar sangue, a 37 °C. De maneira geral, a conversão à fase de levedura está restrita à borda da colônia. O estado leveduriforme também pode ser conseguido com a inoculação em animais de laboratório.

Sporothrix schenckii Hoktoen et Perkins, 1900.

Fase filamentosa:

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é rápida, atingindo a maturidade em 4 dias. A 30 °C, as colônias são pequenas (alcançam 3 a 4 cm em 2 semanas), planas, úmidas, glabrosas ou membranosas e leveduriformes, tornando-se, em seguida, consistentes, rugosas e com dobras. A superfície central pode ser altamente rugosa e quebradiça. A pigmentação das colônias varia grandemente; elas são, inicialmente, brancas ou creme, mas tornam-se amarelas, marrom-escuro, cinza-escuro ou, frequentemente, negras. Alguns isolados apresentam-se negros desde o início, enquanto outros demoram muito ou nunca se tornam escuros. As colônias dificilmente são flocosas ou algodonosas. Apesar de as hifas aéreas serem raras, pode ser produzido um pequeno micélio aéreo, dando um aspecto velutino à cultura. O reverso é hialino.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são hialinas, delgadas (1 a 3 μm de diâmetro), septadas e ramificadas. Os conidióforos são delgados e afilados, eretos ou decumbentes, com 1 a 2 μm de diâmetro na base e 0,5 a 1 μm na extremidade e se desenvolvem em ângulos retos, a partir da hifa vegetativa. Uma expansão na extremidade dos conidióforos forma uma vesícula com dentículos que dão origem a conídios simples, resultando em um arranjo em forma de flor. A esporulação pode ocorrer também lateralmente no conidióforo ou diretamente na hifa vegetativa. Dois tipos de conídios podem ser produzidos. Um tipo é hialino, de paredes delgadas, oval a elíptico ou piriforme, medindo 2 a 3 × 3 a 6 μm e produzido em *bouquet* no ápice dos conidióforos ou diretamente na hifa vegetativa. O outro tipo é escuro, de paredes espessas, esférico a oval ou triangular, e mede de 2 a 4 μm; é formado em pequenos dentículos ou delicados conidióforos ao longo da hifa vegetativa. A intensidade da pigmentação da colônia está diretamente ligada à quantidade de conídios de paredes escuras produzidos.

Fase leveduriforme:

- **Morfologia macroscópica:** a 37 °C, a colônia é branca a amarelo-acinzentada, de consistência pastosa e leveduriforme. Algumas vezes é glabrosa, semelhante às colônias de bactérias.
- **Morfologia microscópica:** as células de levedura gemulantes (1 a 4 × 3 a 10 μm) são esféricas, ovais e em forma de charuto.

A caracterização fenotípica das espécies do complexo *Sporothrix schenckii* pode ser procedida com base na morfologia dos conídios, considerando o tipo (séssil e simpodial), tamanho (medida do diâmetro da colônia), formato (obovoides, globosos, semiglobosos, triangulares, cuneiformes e elipsoides) e coloração (hialinos, subhialinos e demáceos) dessas estruturas, termotolerância (37 °C) e assimilação de carboidratos (sacarose, rafinose e ribitol). Resumidamente, as características morfofisiológicas a serem consideradas para a identificação das espécies do complexo *S. Schenckii* são apresentadas no Quadro 63.3.

Quadro 63.3 Principais aspectos morfológicos e bioquímicos para a diferenciação das espécies do complexo *Sporothrix schenckii*.

Fungo	Presença de conídios sésseis pigmentados	Colônias em BDA 30 °C/21 dias > 50 mm	Termotolerância 37 °C	Assimilação	
				Sacarose	Rafinose
S. albicans	-	+	+	+	-
S. brasiliensis	+	-	+	-	-
S. globosa	+	-	-	+	-
S. luriei	-	-	+	-	+/-
S. mexicana	+	+	+	+	+
S. schenckii sensu stricto	+	-	+	+	+

- **Métodos não culturais:** Apesar de técnicas sorológicas (aglutinação em tubo, aglutimação em látex, imunodifusão em ágar, imunoeletroforese, contraimunoeletroforese, imunofluorescência indireta e ELISA) estarem diponíveis, essas provas mostram considerável variação na sensibilidade e especificidade e seu emprego está mais limitado ao diagnóstico das formas extracutâneas da esporotricose. De qualquer modo, a utilização do sorodiagnóstico deve estar associada a uma forte suspeita clínica. Com relação aos testes cutâneos com esporotriquina, estes têm maior aplicação nos estudos epidemiológicos do que no diagnóstico de casos clínicos. A radiografia de tórax pode comprovar a presença de infiltração miliar, áreas de opacidade localizada, cavitação, atelectasia e adenopatias hilomediastinais. Não há tendência à calcificação das lesões resolvidas. A forma osteoarticular da esporotricose também pode ser visualizada em imagens radiográficas.

Diagnóstico diferencial

Uma grande variedade de processos patológicos pode mimetizar as alterações produzidas pela esporotricose. As formas cutâneas devem ser distinguidas de blastomiocose, cromomicose, micetoma, paracoccidioidomicose, leishmaniose, carbunco, sífilis, tuberculose cutânea e infecções por *Nocardia* sp. e *Staphylococcus* sp. Na forma pulmonar, sarcoidose, tuberculose, neoplasias e outras micoses devem ser consideradas. A artrite reumatoide pode se assemelhar à esporotricose óssea. A esporotricose de córnea é clinicamente indistinguível de outras ceratites.

Prognóstico e tratamento

As formas cutâneas e linfocutâneas são de evolução crônica, o paciente apresenta bom estado geral e o prognóstico é favoravel com o tratamento. Entretanto, o prognóstico é grave, no caso das formas disseminadas e algumas formas pulmonares. Tradicionalmente, o tratamento da esporotricose cutânea e linfocutânea tem sido feito com a administração de iodeto de potássio ou iodeto de sódio. A aplicação local de calor tem sido utilizada para tratar aquelas formas cutâneas pouco complicadas. Atualmente, a quimioterapia antifúngica com derivados azólicos (itraconazol, posaconazol e fluconazol), poliênicos (anfotericina B deoxicolato e lipídica), alilaminas (terbinafina), 5-fluorocitosina, griseofulvina e iodeto de potássio tem sido empregada para o tratamento de todas as formas de esporotricose. Dependendo das circunstâncias clínicas, corticoterapia e intervenção cirúrgica podem ser também propostas.

EUMICETOMA

Etiologia e epidemiologia

O eumicetoma é uma síndrome crônica que compromete o tecido cutâneo e subcutâneo, fáscias e ossos. Pés e membros inferiores são os principais sítios afetados. No entanto, tem sido também relatado o envolvimento de mãos, tronco, pescoço, nuca, couro cabeludo e seios paranasais. Clinicamente, o eumicetoma se caráteriza por apresentar tumefação, tratos sinuosos e formação de grãos de coloração branca ou negra. A etiologia dessa condição é extremamente heterogênea e fungos dos Filos Deuteromycota (fungos anamórficos) e Ascomycota têm sido isolados. Dentre esses agentes, *Madurella mycetomatis e Madurella grisea* são microrganismos de ocorrência mais frequente. Outros isolados são *Acremonium falciforme, Acremonium kiliense, Acremonium recifei, Aspergillus nidulans, Cylindrocarpon destructans, Exophiala jeanselmei, Fusarium monilifrome, Fusarium solani, Leptosphaeria senegalensis, Leptosphaeria tompkinsii, Neotestudina rosatii, Pseudoallescheria boydii* e *Pyrenochaeta romeroi*. Os fungos produtores de eumicetoma são sapróbios de solo e vegetais e sua distribuição na natureza parece ser influenciada pelo clima. A doença é prevalente em regiões tropicais e subtropicais e apenas ocasionalmente é observada em zonas temperadas. Áreas de endemicidade são encontradas em países da África, América Latina, Oriente Médio e Ásia. O grupo de pessoas mais afetado é composto, principalmente, por pacientes do sexo masculino com idade entre 20 e 50 anos, que vivem e trabalham em áreas rurais.

Clínica e patologia

Os agentes fúngicos são implantados no tegumento por traumatismos com material lacerante de natureza vegetal. O pé (dorso, planta e tornozelo) é a região anatômica mais acometida, compreendendo cerca de 70% a 80% dos casos. Normalmente, o estado geral dos pacientes não se altera com a doença. A infecção surge no local do traumatismo como nódulos subcutâneos pequenos, elevados, endurecidos, indolores e não aderidos às estruturas subjacentes que, normalmente, são recobertos por pele fina e estirada e de coloração violácea a avermelhada. Com a progressão da infecção, os nódulos amolecem, fistulam e ulceram, drenando um exsudato purulento e viscoso, contendo grãos. As lesões nodulares podem persistir ou evoluir lentamente para formar grandes placas supurativas e áreas multilobuladas e tumorais. A superfície dessa região se apresenta distendida, despigmentada, atrófica, cicatricial e crostosa, com números abscessos, que se formam conectados a tratos sinuosos, que surgem como vasos sob a pele lesionada. Fístulas e úlceras cutâneas, que drenam descargas purulentas e sanguinolentas e grãos, são formadas a partir desses tratos sinuosos. A infecção também avança por contiguidade a planos subcutâneos, atingindo fáscias, ossos (osteólises) e articulações (artrites). Nervos, músculos e tendões e vasos sanguineos parecem ser relativametne resistentes à invasão fúngica. Metástases linfáticas são pouco comuns. Normalmente, a função dos membros não é comprometida até os últimos estágios da doença, quando uma sensibilidade dolorosa pode surgir. Nessa fase, podem estar presentes adenopatias satélites, necrose e gangrena. As infecções bacterianas secundárias são importantes complicações. Deformações anatômicas também podem ser observadas.

Uma forma clínica associada ao eumicetoma é o micetoma causado por actinomicetos aeróbios (*Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri*, *Streptomyces somaliensis*, *No-*

cardia asteroides, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia otitidiscaviarum* e *Nocardiopsis dassonvillei*). O actinomicetoma é semelhante ao micetoma fúngico, tanto no aspecto clínico quanto no histopatológico. A via de infecção é por traumatismo com material vegetal, a evolução é crônica e, por contiguidade, acomete tecidos e estruturas adjacentes, e a tríade clínica (tumefação, tratos sinuosos e grãos) também está presente. A doença segue o mesmo padrão epidemiológico, sendo, igualmente, mais encontrada em zonas tropicais e subtropicais. No entanto, ao contrário dos eumicetomas, os actinomicetomas parecem apresentar um curso mais maligno e destrutivo e menos localizado, com invasão de músculos e múltiplas e pequenas lesões ósseas. Além disso, morfologicamente, essa condição é menos definida do que os eumicetomas. O envolvimento de couro cabeludo, da nuca e do dorso do tronco pode redundar em meningoencefalites decorrentes de invasão dos ossos cranianos e vertebrais. A botriomicose é outro processo relacionado clinica e patologicamente aos micetomas por fungos e actinomicetos. Essa entidade é causada por bactérias como *Actinobacillus lignieressi*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *P. aeruginosa* e *Staphylococcus* sp., que produzem uma lesão piogranulomatosa crônica do teciodo cutâneo e subcutâneo, com produção de grãos. Essas lesões se apresentam, ainda, tumorais e localizadas e acometem frequentemente os membros inferiores e pés.

Diagnóstico laboratorial

- **Exame microscópico direto e hitopatologia:** a visualização de grãos de coloração branca, amarela ou negra no material clínico tratado com KOH de 10% a 20%, permite o diagnóstico presuntivo de micetoma. Para a diferenciação entre eumicetoma e actinomicetoma devem ser avaliados tamanho, cor, consistência e estrutura desses grãos. Os grãos de eumicetoma apresentam um tamanho de até 2,0 mm e são formados por hifas com 2 a 6 μm de largura, com vesículas grandes (15 μm) e globosas na margem. Nos actinomicetomas, os grãos têm dimensões que podem chegar a 10 mm e são constituídos por filamentos tubulares com diâmetros de 0,5 a 1,0 μm e elementos cocoides e bacilares. A histopatologia com hematoxilina e eosina (HE) permite visualizar grãos de aspecto amarronzado, quando se tratar de eumicetoma, e homogeneamente eosinofílico, quando for actinomicetoma. A coloração de Gram é de pouco valor para a determinação dos elementos fúngicos, mas em actinomicetomas é possível visualizar filamentos finos e ramificados Gram-positivos. O emprego de preparações micopatológicas, ácido periódico de Schiff (PAS) e Gromori-Grocott (prata) permite determinar a natureza fúngica dos grãos, identificando, especificamente, o eumicetoma. A morfologia dos grãos pode ser assim descrita:
  - *Acremonium* sp.: Grãos: os grãos são brancos a amarelo-claros, macios e de tamanho variável, medindo em torno de 1,5 mm. Esses são compostos de densa massa delgada de hifas hialinas septadas com vesículas ou hifas dilatadas. Os grãos, em alguns casos, podem ser semelhantes aos do *Fusarium* sp. ou *P. boydii*. Os grãos de *P. boydii*, contudo, tendem a conter númerosas vesículas.
  - *Exophiala jeanselmei:* Grãos: os grãos são serpiginosos ou vermiformes, com centro oco. Esses são negros ou marrom-escuros, de consistência macia e de tamanho variável, medindo em torno de 1 mm. As hifas da parte externa ou da superfície de crescimento são compostas por hifas marrons, de paredes espessas e células dilatadas, que medem 5 a 10 μm. A parte interna do grão é composta por hifas menores e degeneradas e fragmentos hifálicos. Leucócitos e células gigantes podem ser encontrados dentro do grão oco.
  - *Leptosphaeria* sp. *(L senegalensis e L. tompkinsii):* Grãos: os grãos são negros a marrom-escuros, macios, tubulares, alcançando 1 mm de diâmetro. Algumas vezes, grandes agregados de fragmentos de gãos "velhos" podem ser encontrados ao lado de grãos de tamanho normal. Podem ser ocos com uma periferia escura, lembrando os de *E. jeanselmei, P. romeroi e M. grisea*. Contudo, os grãos de *Leptosphaeria* sp. apresentam vesículas bem maiores (15 a 40 μm) e númerosas hifas arranjadas irregularmente. A zona periférica escura pode ser de 30 a 60 μm de largura, com um cemento marrom, no qual as vesículas estão embebidas. A parte central dos grãos pode ser livre de filamentos fúngicos ou pode ser preenchida com substância marrom e com alguns filamentos fúngicos septados e vesículas. As vesículas (1 mm) têm paredes escuras. A coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS) ou por Gromori-Grocott (prata) diferem os elementos fúngicos prontamente.
  - *Madurella mycetomatis:* Grãos: os grãos são negros, firmes e globosos, ovais ou lobulados e "quebradiços". Usualmente, têm 0,5 a 1 μm, mas podem atingir até 5 μm, quando há agregação de alguns grãos. Os grãos são compostos por hifas marrom-claras que têm 1 a 5 μm e apresentam células terminais expandidas de 12 a 15 μm, podendo chegar a 30 μm, na margem dos grãos. Dois tipos de grãos são descritos. O primeiro é compacto e preenchido com um cemento granular marrom-escuro entre os elementos hifálicos. Quando a coloração com a hematoxilina e eosina (HE) é empregada, essa matriz se apresenta com coloração marrom-ferrugem. O outro tipo, denominado vesicular, apresenta um centro claro e as hifas da periferia são marrons e preenchidas com vesículas que medem 6 a 15 μm de diâmetro.
  - *Madurella grisea:* Grãos: os grãos são negros, globosos a lobulados, alcançam 1 mm de diâmetro; macios, inicialmente, mas tornam-se firmes e "quebradiços". Diferentemente dos grãos sólidos da *M. mycetomatis*, os grãos da *M. grisea* têm cores claras ou são não pigmentados nas áreas centrais e apresentam uma

frouxa rede de hifas hialinas e pequenas (1 a 3 μm), semelhante a uma cadeia de células de levedura gemulantes, e material intersticial marrom na periferia.

- *Neotestudina rosatii:* Grãos: os grãos são esféricos ou mais ou menos poliédricos, brancos a amarronzados, macios e medem 0,5 a 1,5 mm. Um cemento pigmentado ou hialino em torno de hifas convolutas (em espiral) é evidente nesses grãos. As hifas da camada externa são delgadas, septadas e ramificadas. Em direção ao centro dos grãos, as hifas se quebram para dar origem a células em forma de vesículas. A visualização de um cemento claro com uma periferia escura e vesicular é característica dessa espécie.
- *Pseudoallescheria boydii:* Grãos: os grãos são grandes (até 2 mm), brancos a amarelos, macios a firmes, subglobosos a lobulados. As hifas da parte central são hialinas e medem de 2 a 5 μm. Na periferia, as hifas são largas, septadas e entrelaçadas, mostrando númerosas células dilatadas ou vesículas, globosas a subglobosas (15 a 20 μm).
- *Pyrenochaeta romeroi:* Grãos: os grãos são macios, negros, esféricos, tubulares e irregularmente curvados (vermiformes), medindo 0,5 a 1,5 μm de diâmetro. Os grãos são desprovidos de material intersticial e a parte central é de colação mais clara, aumentando de intensidade em direção à periferia. Células dilatadas são encontradas na margem dos grãos.
- *Cultura:* Os grãos devem ser inoculados em ágar de Sabouraud dextrosado, suplementado com antibióticos e sem cicloheximida, para o isolamento de culturas fúngicas. A incubação deve ser feita por um período de 5 a 10 semanas, a 30 °C e 37 °C. O estudo das estruturas conidiais e dos ascocarpos é a base para a identifcação das espécies dos Filos de Deuteromycota e Ascomycota, respectivamente. Para tanto, outros meios como ágar milho, ágar batata dextrosado (BDA) e ágar Czapec-Dox podem ser necessários.
- *Métodos Não Culturais:* a radiografia e a tomografia computadorizada podem detectar anormalidades, como aumento da densidade de tecidos moles afetados, hipertrofia óssea e proliferação de periósteo, fusão óssea, osteólise e cavitações, osteoporose e infiltração medular. Os achados radiográficos permitem a avaliação do grau de comprometimento do órgão e o estabelecimento de estratégias terapêuticas. A ultrassonografia e a ressonância magnética podem ser também empregadas no diagnóstico por imagem de micetomas. Provas sorológicas (teste de imunodifusão) com antígenos citoplasmáticos têm sido utilizadas na detecção de anticorpos, para agentes fúngicos.

Diagnóstico diferencial

Os processos a serem considerados são aqueles que em algum momento da evolução clínica apresentam lesões nodulares, abscessos, fístulas, supuração, fibrose ou granulações. Cromoblastomicose, esporotricose, micetoma dermatofítico, actinomicose, sífilis, tuberculose, botriomicose ou granuloma piogênico devem ser diferenciados dos eumicetomas.

Prognóstico e tratamento

Normalmente, os eumicetomas não trazem riscos à vida dos pacientes e, nesse sentido, seu prognóstico é bom. No entanto, algumas lesões podem comprometer a função dos membros e terem como opção terapêutica tratamentos não conservantes. Os micetomas causados por fungos respondem pobremente à quimioterapia antifúngica. As drogas com maior efetividade são o cetoconazol eoitraconazol que, com frequência, são adminstradas em doses mais elevadas. Fluconazol, miconazol, posaconazol e voriconazol, todavia, podem ser também utilizados. Griseovulvina, anfotericina B e iodeto de potássio podem ser outras propostas propedêuticas. Intervenções cirúrgicas com desbridamento da lesão e/ou amputação de membros podem ser requeridas. A combinação de terapia farmacológica e cirurgia parecem ser a mais adequada; contudo, recorrências têm sido relatadas.

FEOIFOMICOSE

Etiologia e epidemiologia

A feoifomicose compreende um grupo heterogêneo de infecções determinadas por uma grande variedade de fungos de coloração negra. O fator comum entre esses organismos é a produção de pigmentos menaloides na parede celular, o que confere uma coloração escura aos elementos fúngicos. Não obstante a diversidade de quadros clínicos, os agentes da feoifomicose são observados nos tecidos como filamentos septados e ramificados de aspecto negro ou demáceo. A feoifomicose pode ser considerada uma entidade histopatológica, mais do que uma entidade clínica. Os agentes da feoifomicose são, normalmente, encontrados na natureza como sapróbios de solo e vegetais, atingindo o parênquima de órgãos e tecidos pela inalação e, mais frequentemente, por traumatismo por corpos vulnerantes de natureza vegetal. Estima-se que associados à feoifomicose existam cerca 70 gêneros com mais de 150 espécies fúngicas. Contudo, a cada ano, novas espécies são isoladas e incorporadas ao grupo de agentes etiológicos.

Dentre os principais fungos envolvidos em casos de feoifomicose podem ser citados: *Alternaria* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Bipolaris* sp., *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp., *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Exserohilum* sp., *Phaeacremonium* sp., *Phialophora* sp., *Phoma* sp., *Helminthosporium* sp., *Neoscytalidium* sp. A maioria desses fungos pertence ao Filo Deuteromycota. Esses organismos são distribuídos na natureza de maneira ampla, sendo, tipicamente, cosmopolitas e ubiquitários e contaminantes dos ambientes, podendo ser isolados de vegetação, solo, água, domicílios e hospitais. A feohifomicose acomete ambos os sexos indistintamente, mas predomina em indivíduos adultos do sexo masculino. Em relação à idade, tem sido observado em crianças e idosos. No entanto, parece acometer pacientes entre 30 e 50 anos. Não há predisposição de grupos ***étnicos ou ocupacionais, todavia*** lavradores e agricultores são

frequentemente associados com essa enfermidade. A maioria dos pacientes é de indivíduos imunocomprometidos, que têm como patologia de base tumores sólidos ou hematológicos, doenças degenerativas, infecciosas e metabólicas, desnutrição, politraumatismo, bem como podem estar submetidos à corticoterapia, cateterismo, diálise e transplantes.

As várias formas de feoifomicose podem apresentar diferenças em sua distribuição e taxa de incidência. A feohifomicose cutânea e subcutânea é observada nas áreas tropicais, subtropicais e temperadas. As lesões císticas ocorrem, principalmente, em adultos com mais de 50 anos (50%). Não há predisposição de sexo ou raça, todavia, pacientes imunocomprometidos parecem ser mais predispostos. Essas lesões são frequentes em trabalhadores de áreas rurais. Lesões cerebrais também apresentam uma distribuição mundial, sendo reportada na Europa, Ásia, África e América. Acomete, comumente, pacientes entre 20 e 40 anos de idade. Entre os sexos, a taxa de morbidade é claramente maior para o sexo masculino. Predisposições raciais ou ocupacionais não têm sido observadas.

Clínica e patologia

A feoifomicose pode ser classificada em superficial, subcutânea, sistêmica e visceral. A doença superficial é normalmente representada por queratomicoses, otomicoses e onicomicoses. Aquela considerada subcutânea é representada pelo cisto feoifomicótico. A doença sistêmica ou viceal está ligada à feoifomicose profunda ou de órgãos internos. Importa mencionar, no entanto, que aquelas condições clinicamente bem estabelecidas e específicas, como *tinea nigra*, piedra negra, cromoblastomicose e feomicetoma (caracterizada pela presença de grãos negros) não são incluídas na feoifomicose.

As manifestações dermatológicas são variadas nessa condição. As infecções superficiais, comumente causadas por *Neocytalidium* sp., são crônicas e secas e afetam a palma da mão e planta dos pés, podendo produzir rachaduras interdigitais e hiperqueratose assintomática. Unhas se apresentam distróficas e escurecidas (meloníquia fúngica), onicólise e espessamento. Frequentemente, esse quadro clínico é indistinguível das infecções por dermatófitos e outros fungos negros, causando lesões subungueal distal, distrófica total e paroníquia.

A feoifomicose subcutânea, tipicamente é decorrente de implantação traumática, tendo como apresentação clínica mais usual o cisto feoifomicótico (nódulo ou abscesso), que surge na tela subcutânea e que pode se desenvolver em qualquer parte do corpo (joelhos, dedos, mãos, pulsos, nádegas, face, pescoço e couro cabeludo). A lesão é encapsulada e assintomática, podendo atingir cerca de 2 cm de diâmetro. Em geral, esses nódulos são solitários e localizados, apresentando pápulas e abscessos como origem.

A forma subcutânea nodular disseminada é menos frequente, sendo visualizada em pacientes imunocomprometidos. Essa forma é encontrada em membros inferiores e superiores, contudo, pode haver disseminação para outras regiões. A enfermidade tem início como uma pápula que se desenvolve de forma lenta, até formar um ou vários nódulos, que dão um aspecto verrucoso à lesão. Não há purido e nem dor à palpação. Pode evoluir para um processo cistoide duro de vários centímetros. Além disso, pode haver a formação de úlceras e drenagem de secreções purulentas contendo hifas negras. Os nódulos são pequenas massas indolentes, palpáveis e não unidas à epiderme. A área central pode sofrer necrose, determinando a formação de abscesso encapsulado.

A feoifomicose invasiva, disseminada ou cerebral, está, em geral, associada a pacientes imunocomprometidos e, muito raramente, a pacientes imunocompetentes. Os pacientes imunocomprometidos são aqueles submetidos a transplantes de órgãos ou medula óssea, corticoterapia, citostático e cirurgias, neutropênicos, politraumatizados, queimados e doenças neoplásicas. Normalmente, a via de entrada está relacionada com a inalação de conídios e elementos fúngicos em suspensão no ar atmosférico, determinando um quadro pulmonar, que pode ser assintomático ou haver disseminação a outros órgãos, incluindo o encéfalo, onde a formação de abscessos é o aspecto clínico mais conspícuo. Uma síndrome neurológica pode estar presente com um quadro de cefaleia, astenia, adnamia, perda de memória e confusão mental, diplopia e estrabismo, incoordenação motora, coma, parada respiratória e morte. Outras formas relacionadas ao trato respiratório são sinusites crônicas e invasivas, quadros de asma, pneumonia, nódulos parenquimatosos assintomáticos ou lesões endobranquiais, que podem produzir hemoptise. A doença disseminada pode estar ainda associada a endocardites, osteomielites, esofangites e fungemias.

A rinosinusite feoifomicótica, que acomete pacientes imunocompetentes, pode levar a sinusites crônicas e à formação unilateral de bola fúngica nos seios paranasais esfenoidais e etmoidais. Nessa síndrome, há obstrução nasal crônica e descarga retronasal. Casos assintomáticos podem ocorrer, mas frequentemente essa condição cursa com dor.

Diagnóstico laboratorial

A determinação da etiologia apresenta certa dificuldade, tendo em vista a heterogeneidade dos agentes causais e a multiplicidade dos aspectos clínicos. Os fungos envolvidos na feoifomicose são contaminantes dos ambientes, sendo o estudo micológico baseado em métodos morfológicos que, pela grande variedade de espéceis e a necessidade de conhecimentos taxonômicos, torna o diagnóstico laboratorial complexo.

- **Exame direto e histopatologia:** as estruturas fúngicas presentes nos espécimens clínicos podem ser observadas em preparações a fresco com KOH 10% ou 20%. Ao microscópio é possível encontrar hifas septadas, demáceas e ramificadas. Dependendo do agente etiológico, podem ser observados, ainda, blastósporos, pseudohifas e artrósporos. As hifas podem ter forma, tamanho e espessura de parede variados. As colorações histopatológicas, como ácido periódico de Schiff (PAS), Gromoti-Grocott (prata) e Fontana-Masson são úteis na detecção do elemento fúngico tecidual.
- **Cultura:** o isolamento dos agentes causais pode ser procedido em meios de rotina utilizados no laboratório

de micologia médica, como ***á***gar de Sabouraud dextrosado (SDA), ágar batata dextrosado (BDA), ***á***gar malte, ***á***gar infusão de cérebro-coração (BHIA); com frequência os fungos isolados são sensíveis à cicloheximida. Em decorrência disso, culturas pareadas em meios contendo antimicrobianos e livres desses devem ser utilizados. As culturas devem ser incubadas a temperatura de 30 °C e, eventualmente, a 37 C. As macro e micromorfologias típicas estão presentes entre 10 e 20 a 30 dias. O aspecto colonial observado é filamentoso, velutino, algodonoso, de coloração acinzentada a negra ou olivácea. Algumas culturas podem apresentar uma textura leveduriforme.

Alternaria Nees ex Wallroth, 1833 *nom. cons.*

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é rápida, atingindo a maturidade em cinco dias. A superfície é, inicialmente, branco-acinzentado e penugenta; posteriormente, torna-se cinza escuro, amarronzada, verde-oliva ou cor de "fumaça", com bordos claros. Pode, eventualmente, ser coberta com um pequeno micélio aéreo acinzentado. O reverso é negro.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são septadas, ramificadas e escuras. Os conidióforos são septados e de comprimento variado, curtos e inconspícuos ou longos; algumas vezes, ramificados, com conídios em sua extremidade. Os conídios isolados ou em cadeias são grandes (7 a 10 × 23 a 34 μm), marrons, com septações transversais e longitudinais, muriformes, ovalados a alongados, normalmente mais arredondados na região próxima ao conidióforo e mais estreito e afilado na porção distal, assumindo, por isso, uma aparência de "taco".
- **Principais espécies:** *A. alternata, A. atrum/Ulocladium atrum, A. caespitosa/Botryomyces caespitosus, A. infectoria/Lewia infectoria*.

Aureobasidium pullulans (De Bary) Arnand, 1918.

- **Morfologia microscópica:** a taxa de crescimento é moderadamente rápida, atingindo a maturidade em sete dias. A colônia tem, inicialmente, um aspecto leveduriforme; é branca a rosada, tornando-se, com o tempo, marrom-escuro ou negra, brilhante e consistente, elevada, rugosa e com franjas de micélio submerso em sua margem. O reverso é negro.
- **Morfologia microscópica:** dois tipos de hifas são produzidas. Um tipo é constituído por hifas hialinas, septadas, delgadas e de paredes finas, que produzem conídios diretamente a partir da parede celular da hifa vegetativa em certos pontos férteis. O outro tipo é formado por hifas demáceas, muito septadas, de paredes espessas, com algumas células formando pequenos tubos ou conidióforos (dentículos) que produzem conídios. Os conídios são hialinos ou pigmentados, ovalados a elípticos, medindo 4 a 6 × 8 a 12 μm, e, após formados, continuam a se multiplicar por gemulação, dando origem a uma série secundária de blastósporos em cadeia ou agrupados em massa em torno do conidióforo. A germinação dos conídios pode dar origem a colônias leveduriformes de coloração pigmentadas ou brancas. Estas últimas lembram uma colônia de *Candida*. As hifas também podem produzir artrósporos demáceos. Todos esses tipos morfológicos podem estar presentes em quantidades variadas, influenciados pelas condições de cultivo empregadas.

Bipolaris Shoemaker, 1959.

- **Morfologia macroscópica:** crescem rapidamente. A superfície da colônia pode ser cinza, marrom, cor de "fumaça" ou negra e penugenta a velutina.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são septadas, ramificadas e marrons. Os conidióforos são bem desenvolvidos, escuros, septados, frequentemente simples, mas algumas vezes ramificados. Os conídios são escuros, grandes e horizontalmente pseudosseptados e produzidos por poros na parede do conidióforo de maneira isolada. O *Bipolaris* é semelhante à *Drechslera* na morfologia do conídio e em seu modo de formação.
- **Principais espécies:** *B. australiensis/Cochiobolus australiensis, B. oryzae, B. hawaiiensis/Cochliobolus hawaiiensis, B. spicifera/Cochliobolus spicifer.*

Cladosporium Link ex Gray, 1821.

- **Morfologia microscópica:** a taxa de crescimento é moderada a rápida, atingindo a maturidade em cinco dias. A superfície apresenta uma coloração cinza-esverdeado, verde-oliva escuro, marrom-esverdeado ou negra, uma textura pulverulenta, velutina ou, algumas vezes, penugenta, e uma topografia plana ou elevada com dobras radiais.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são septadas, ramificadas e escuras. Os conidióforos são também escuros, eretos, irregularmente ramificados próximo à extremidade, dando origem a uma estrutura conidial em forma de "galho de árvore", com comprimento variável e uma ou mais cadeias irregulares de conídos. Os conídios (3 a 6 × 4 a 12 μm) são marrons, ovais, cilíndricos ou em forma de "escudo", usualmente lisos a rugosos, com escaras nos pontos de ligação com o conidióforo ou com os outros conídios, e que prontamente se destacam da cadeia.
- **Principais espécies:** *C. cladosporioides, C. herbarum/Davidiella tassiana, C. oxysporum*.

Cladophialophora bantiana (Saccaro) de Hoog, Kwong-Chung & McGinnis, 1995.

- **Morfologia macroscópica:** as colônias são de crecimento lento, verde-oliva a cinza-amarronzado, flocosa, velutina e reverso negro. Cresce a temperatura de 42 a 43 °C.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são septadas, demáceas, ramificadas e longas, cadeias onduladas de

conídios (3,5 a 6 × 7 a 17 μm) subglobosos, ovoides ou elipsoides, com infrequentes ramificações. Essas cadeias de conídios (5 a 10/20 a 35 células) se mantêm intactas, sem fraturas ou quebras, e são produzidas lateralmente ou na extremidade da hifa ou sobre conidióforos pouco diferenciados.

Curvularia Boedijn, 1933.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é rápida, atingindo a maturidade em 5 dias. A superfície é verde-oliva escuro, marrom ou negra e flocosa ou algodonosa. Reverso é escuro.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são septadas, ramificadas e demáceas. Os conidióforos são marrons, eretos, simples, mas, algumas vezes, são ramificados e curvados nos pontos de formação dos conídios. Conídios grandes (21 a 35 μm), escuros, lisos a rugosos, fusiformes, elípticos e curvos, com 2 a 4 septos transversais, o que os tornam multicelulares, se desenvolvem por meio de poros na parede dos conidióforos. Esses conídios diferem dos da *Drechslera* por terem uma célula central mais escura do que as da extremidade, uma parede celular fina, septações estreitas e um curvamento aparente.
- **Principais espécies:** *C. luneta/Cochliobolus lunatus, C. geniculata, C. senegalensis.*

Drechslera Ito, 1930.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é rápida, atingindo a maturidade em cinco dias. A colônia é, inicialmente, marrom-acinzentada, esverdeada ou negra, posteriormente, apresenta um centro escuro com uma periferia acinzentada. A textura é penugenta e, algumas vezes, velutina. O reverso é escuro.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são septadas e escuras. Os conidióforos são marrons, septados ou raramente ramificados, encurvados, produzindo conídios simples por meio de pequenos poros no ápice ou abaixo desse, o que dá uma aparência de zigue-zague ao conidióforo. Os conídios (6 a 12 × 16 a35 μm) são escuros, de paredes espessas, oblongos a cilíndricos e multisseptados transversalmente, contendo quatro ou mais células.
- **Principais espécies:** *D. nobleae, D. dematioidae.*

Exophiala Carmichael, 1966.

- **Morfologia macroscópica:** as colônias têm um aspecto semelhante às de leveduras, com coloração negra, negra-esverdeada a castanho-escuro, delgadas e lisas. A textura, em seu início, é úmida, mucoide, pastosa, viscosa, mas, com o tempo, torna-se micelial, coberta com hifas aéreas aveludadas, perdendo a aparência viscosa.
- **Morfologia microscópica:** mostram, inicialmente, muitas células de levedura gemulantes, elipsoides, subglobosas, com anelações, livres ou em cadeias. As hifas são septadas, lisas e amarronzadas, produzindo conidióforos retos, rígidos, lisos ou espiculados, simples ou ramificados, em sua parte lateral, em ângulos de 45º a 90º, ou em seu ápice. Alguns conidióforos podem se apresentar como cadeias de células oblongas. As células conidiogênicas ou fiálides marrons com anelações cilíndricas podem estar tanto integradas quanto se desenvolverem nas extremidades de conidióforos ou hifas. Algumas fiálides podem produzir um colarete. Conídios unicelulares, subglobosos, cilíndricos, lisos e hialinos podem se apresentar espalhados acima e ao longo dos conidióforos e hifas. Podem, ainda, ser produzidos diretamente na hifa em sua porção lateral. Uma disposição conidial com formação em bolas de conídios ou agregados em massas pode ser observada na extremidade de células conidiogênicas.
- **Principais espécies:** *E. dermatitidis, E. jeanselmei, E. oligosperma, E. spinifera.*

Exserohilum Leonard e Suggs, 1974.

- **Morfologia macroscópica:** cresce rapidamente. As colônias são de coloração amarronzada, esverdeada, acinzentada, cor de "fumaça" ou negras. A textura é penugente a velutina. O reveso é escuro.
- **Morfologia microscópica:** os conídios são multisseptados e multicelulares, elipsoides a fusiformes e exibem um hilo truncado e protuberante. Os conídios produzem um septo espesso e escuro, acima do hilo e próximo da extremidade da célula. Em conídios jovens, o septo pode não ser observado. As hifas são septadas, demáceas e ramificadas.
- **Principais espécies:** *E. rostratum/Setosphaeria rostrata.*

Neoscytalidium dimidiatum (Penz.) Crous & Slippers, 2006 e *Neoscytalidium hyalinum* (Campbell & Mulder) Phillips, Groenewald & Crous, 2013.

- **Morfologia macroscópica:** *Neoscytalindium* sp. apresenta-se tanto como um fungo demáceo (*N. dimidiatum*) quanto como um fungo hialino (*N. hyalinum*). Crescimento médio de um a três dias. A espécie demácea apresenta colônias algodonosas, de coloração cinza- escuro ou negro-acastanhado. O micélio aéreo alcança a tampa da placa ou a rolha do tubo. Há a produção de um pigmento que se difunde por todo o meio de cultura. O reverso é creme ou amarelo-ocre. A variedade hialina apresenta colônias de crescimento rápido, preenchendo toda a placa. O fungo exibe uma textura cotonosa ou lanosa e aspecto plano, coloração branco-acinzentado e reverso também amarelo-ocre.
- **Morfologia microscópica:** na variedade demácea, inicialmente, as hifas septadas e ramificadas são hialinas, mas, posteriormente, se convertem em demáceas, formando artrósporos demáceos por fragmentação e desarticulação. Esses artrósporos

podem se apresentar com paredes delgadas ou espessas, cilíndricos a elipsoides, livres ou em cadeias, e podem ser indiferenciadas das hifas vegetativas. Picnídios (corpos de frutificação assexuados) podem ser produzidos. O exame microscópico da variedade hialina revela hifas septadas e ramificadas e cadeias de artróporos hialinos.

Phoma Saccardo, 1880.

- **Morfologia microscópica:** a taxa de crescimento é moderada a rápida, atingindo a maturidade em cinco dias. A superfície é pulverulenta a velutina, cinza-oliváceo escuro, marrom-acinzentado, marrom-escuro. O reverso é negro. Algumas espécies produzem um pigmento marrom-avermelhado difuso.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são septadas, largas (70 a 100 μm). Picnídios (corpos de frutificação assexuados) são produzidos. Essas estruturas são escuras, globosas, subglobosas ou piriformes, podendo estar na superfície do ágar ou submersos no meio de cultura, apresentando ostíolo. Conídios (2,5 a 5 μm) unicelulares, hialinos, ovais, elípiticos, curvos ou em forma de bastão são produzidos em células conidiogênicas (fiálides) ou em conidióforos que se alinham no interior do picnídio.
- **Principais espécies***: P. exigua/Boeremia exigua, P shorgina/Epicoccum shorgi*.

Sedosporium prolificans (Malloch et Salkin) Guého et de Hoog, 1991.

- **Morfologia macroscópica:** as colônias são planas e verde-oliva acinzetado por causa da abundante produção de conídios pigmentados.
- **Morfologia microsópica:** os conidióforos são curtos, não ramificados, raramente septados e produzem células conidiogênicas em seu no ápice ou lateralmente. As células conídiogênicas são produzidas isoladamente ao longo da hifa vegetativa ou em *clusters*, na extremidade do conidióforo. As células conidiogênicas são em forma de frasco, com um notável entumescimento na base e um longo pescoço com anelações. Os conídios são ovoides, lisos, oliváceos a marrons, medem 2 a 5 × 3 a 13 μm, podem ser produzidos perscutaneamente ou simpodialmente e estão contidos em aglomerados úmidos na ponta das células conidiogênicas. Alguns isolados podem produzir conídios globosos, solitários, de paredes espessas e rugosas, semelhante a clamidósporos, a partir da extremidade de pequenas células conidiogências cilíndricas que se desenvolvem na lateral da hifa vegetativa.

- **Fase sexuada:** *Lomentospora prolificans.*
  - **Métodos não culturais:** não há testes sorológicos específicos para o diagnóstico da feoifomicose, contudo, o biomarcador panfúngico 1,3-β-D-glucana pode ser utilizado. A PCR e suas variações têm sido empregadas em associação com os estudos culturais, com bons resultados. Recentemente, técnicas de espectrometria de massas, como o MALDI-TOF, têm sido aplicadas à identificação de alguns agentes fúngicos. Imagens radiográficas da cabeça e pulmão e técnicas de hibridização *in situ* podem ser empregadas.

Diagnóstico diferencial

As lesões superficiais devem ser diferenciadas das dermatofitoses e de onicomicoses por outros fungos hialinos. A distinção da feoifomicose subcutânea deve ser realizada com o cisto epidermoide, esporotricose, cromoblastomicose, granuloma por corpo estranho, leishmaniose cutânea, lobomicose, paracoccidioidomicose, coccidioidomicose, micetoma dermatofítico, gânglios enfartados, cistos sebáceos, fibroma e lipoma. A feoifomicose cerebral deve ser distinguida dos abscessos cerebrais bacterianos (*Nocardia* sp.), fúngico (*Cryptococcus* sp.), histoplasmose, coccidioidomicose, esporotricose e neoplasias. Os processos sinusais devem ser diferenciados de doença bacteriana e de outras doenças micóticas (aspergilose/aspergiloma, mucoromicose), rinite alérgica crônica e carcinoma sinusal.

Prognóstico e tratamento

O prognóstico é bom para as formas cutâneas, todavia, é reservado a ruim para as formas cerebrais e sistêmicas em pacientes imunocomprometidos. Intervenções farmacológicas com derivados azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol, posaconazol, tiabendazol e voriconazol), poliênicos (natamicina/pimaricina e anfotericina B tradicional, lipossomal ou lipídica), terbinafina e candinas (micafungina) são procedidas isoladamente e/ou em terapias combinadas ou, ainda, em conjunto com procedimentos cirúrgicos e de recondicionamento imunológico. Importa mencionar que é fundamental, para a efetividade do tratamento, o conhecimento do comportamento dos diferentes agentes da feoifomicose frente aos antifúngicos de uso clínico, por conta da grande variabilidade em suas suscetibilidades.

HIALO-HIFOMICOSE

Etiologia e epidemiologia

A doença é determinada por fungos hialinos diferentes de *Aspergillus s*sp. Apesar de apresentarem uma taxa de incidência menor do que aquela observada para a aspergilose, acomentem também indivíduos imunocomprometidos de forma importante. Em decorrência disso, a hialo-hifomicose é considerada, tipicamente, uma micose oportunista, causada por fungos contaminantes dos ambientes. Essa enfermidade pode ser caracterizada como sendo uma infecção que apresenta hifas septadas, hialinas e ramificadas no tecido dos hospedeiros. Esse termo também é eminentemente uma designação histopatológica que engloba uma gama de agentes

etiológicos diferentes e uma grande variedade de manifestações clínicas. Em tese, a hialohifomicose inclui todos os hifomicetos hialinos agentes de doença. Termos bem estabelecidos e descritivos (aspergilose, fusariose, peniciliose, dermatofitoses), todavia, devem ser mantidos separados e não incluídos na designação de hialo-hifomicose. Atualmente, estima-se que existam mais de 20 gêneros e 70 espécies causando hialo-hifomicose. Os principais agentes são *Acremonium* sp., *Beuaveria* sp. *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Scopulariopsis* sp., *Scedosporium* sp. e *Trichoderma* sp. Na realidade, todos esses fungos guardam características distintas de infecção e doença, fazendo com que a hialo-hifomicose seja uma entidade heterogênea em seus aspectos epidemiológicos, patogênicos e clínicos. Os agentes da hialo-hifomicose são encontrados na naturezacomo contaminantes, apresentando uma distribuição cosmopolita e ubiquitária. Esses organismos são, fundamentalmente, decompositores, mostrando, por isso, baixíssima patogenicidade. Independentemente do agente etiológico, todos aqueles fatores que conduzem a um estado de fragilidade imunológica estão envolvidos na gênese da hialo-hifomicose. Assim, neoplasias sólidas e hematológicas, politraumatismos, queimaduras intensas, internação por longos períodos de tempo em UTI, cirurgias, corticoterapia e antibióticoterapia prolongada levam a uma grande susceptibilidade dos pacientes aos agentes da hialo-hifomicose.

Clínica e patologia

A hialo-hifomicose apresenta uma enorme variedade de aspectos clínicos, desde infecções superficiais até infecções disseminadas, acometendo quase exclusivamente indivíduos com algum comprometimento de sua imunidade. A fisionomia da infecção e o tipo de manifestação clínica estão, na realidade, associados com a patologia de base e com o agente causal fúngico. De maneira geral, os fungos da hialo-hifomicose atingem a intimidade dos parênquimas pela inalação dos elementos fúngicos em suspensão no ar e, menos comumente, por implantação traumática. Vários fungos têm sido relatados como agentes causais da hialo-hifomicose, dentre esses:

- *Acremonium* sp.: abscesso cerebral, artrite, encefalite, endocardite, endofitalmite, fungemia, fungomas pulmonais, granuloma da linha média, infecção de fistula artereovenosa de acesso para hemodiálise, infecção disseminada, meningite, micetoma, onicomicose, osteomielite, peritonite, pneumonia, queratomicose, síndrome broncopulmonar alérgica e sinusite.
- *Beauveria* sp.: infecção disseminada, linfadenite, pneumomicose e queratomicose.
- *Fusarium* sp.: abscesso cerebral, artrite, colonização de feridas por queimaduras, doenças cutâneas e subcutâneas, doença disseminada, encefalite, endocardite, endoftalmite, fungemia, granuloma subcutâneo, infecção de ossos e articulações, meningite, micetoma, onicomicose, osteromielite, otite, paroníquia, peritonite e queratomicose.
- *Paecilomyces* sp.: celulite, endocardite, endoftalmite, fungemia, granuloma orbital, infecções cutâneas e subcutâneas, infecção disseminada, nefrite, osteomielite, otite, peritonite, pielonefrite, pneumonia, sacolacrimal, sinusite e vaginite.
- *Penicillium* sp.: broncopneumonia, endocardite, endoftalmite, fungemia, fungoma pulmonar, infecção cutânea e subcutânea, infecção disseminada, otite, otomicose, peritonite, queratite e sinusite.
- *Scedosporium* sp. (*Pseudoallescheria* sp. e *Lomentospora* sp.): abscessos cerebrais, abscessos pulmonares, artrite, bola fúngica, bronquite alérgica, endocardite, endoftalmite, fungemia, infecções cutâneas e subcutâneas, infecção disseminada, infecção de óssos e articulações, infecção do sistema musculoesquelético, infecção SNC, linfangite nodular, meningite, micetoma, onicomicose, osteomielite, otomicose, peritonite, pneumonia necrosante, queratite e sinusite.
- *Scopulariopsis* sp.: bola fúngica, endocardite, endofitalmite, infecção cutânea e subscutânea, infecção disseminada, infecção plantar, infecção do SNC, micetoma, onicomicose, osteomielite, otomicose, pneumonia e queratite.
- *Trichoderma* sp.: abscesso cerebral, colonização respiratória, infecção disseminada, onicomicose, otomicose e pneumonia.

Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de hialo-hifomicose apresenta grande dificuldade pela escassa especificidade de suas manifestações clínicas e baixa sensibilidade dos métodos micológicos convencionais. O diagnóstico dessa enfermidade se baseia, sobretudo, na observação de elementos fúngicos nos tecidos infectados e seu isolamento em cultura pura.

- **Exame direto e histopatologia:** a detecção tecidual de hifas septadas, hialinas e ramificadas no exame microscópico direto com KOH 10% a 20% permite a determinação genérica de hialo-hifomicose. Eventualmente, hifas (3 a 8 μm) ramificadas dicotomicamente, clamidósporos e conídios podem ser encontrados nos tecidos e em secreções de pacientes. Nas seções histopatológicas coradas pela hematoxilina e eosina (HE), Gromoti-Grocott (Prata), ácido periódico de Schiff (PAS) e Gridley, é possível observar a magnitude do processo inflamatório e/ou visualizar, especificamente, as estruturas fúngicas, aumentando a capacidade de detecção dos patógenos em relação ao exame direto com material a fresco.
- **Cultura:** o isolamento primário é feito em meios usuais de laboratório, como o ágar de Sabouraud dextrosado (SDA) com ou sem claranfenicol, o ágar batata dextrosado (BDA), o ágar infusão de cérebro-coração (BHIA) em tubos ou placas de Petri, que devem ser incubados à temperatura de 25°C a 30 °C, por um período de até 4 semanas. Normalmente, uma colônia de aspecto filamentoso está presente em 2 a 3 semanas. Para todos os agentes da hialo-hifomicose, a micromorfologia irá apresentar hifas septadas, hialinas e ramificadas. As diferenciações da hifa reprodutiva e o modo de produção de

conídios irão variar para cada espécie fúngica e devem ser avaliados para a correta determinação taxonômica das etiologias.

Acremonium Link ex Fries, 1821.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é rápida, atingindo a maturidade em 5 dias. As colônias são, inicialmente, planas, compactas ou com dobras e feltrosas, tornando-se exuberantes pelo supercrescimento de hifas, que dão um aspecto algodonoso. Podem ser brancas, cinzas ou rosas. O reverso é hialino, amarelado ou rosado.
- **Morfologia microscópica:** hifas são hialinas, septadas e ramificadas. Células conidiogênicas afiladas e cônicas, eretas e não ramificadas se formam diretamente sobre as delicadas hifas vegetativas. Os conidióforos normalmente estão ausentes. Os conídios (2 a 3 × 4 a 8 μm) são unicelulares (ocasionalmente bicelulares), globosos, ovoides, cilíndricos ou levemente curvos, produzidos em cachos com aparência de "bola" ou em frágeis cadeias na extremidade das fiálides.
- **Principais espécies:** *A. alabamensis, A. kiliensis/ Sorocladium kiliensis, A. potroni, A. recifei, A. roseogriseum/Sorocladium strictum*.

Beauveria Vuillemin, 1912.

- **Morfologia macroscópica:** apresenta crescimento em moderado. As colônias são de cor branca a canela, tornando-se, com o tempo, pulverulenta.
- **Morfologia microscópica:** a célula conidiogênica é entumescida em sua base e prolifera simpodialmente em traçados de linha reta que formam ângulos ao mudar de direção, produzindo um aspecto geniculado. As células conidigênicas se agrupam em esporodóquios e sinematas.
- **Principal espécie:** *B. bassiana*.

Fusarium Link ex Gray, 1821.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é rápida, atingindo a maturidade em cinco dias. A colônia, inicialmente, é branca e algodonosa ou flocosa, mas frequentemente desenvolve um centro violeta ou rosa com uma periferia mais clara. Algumas espécies se mantêm brancas ou amarelo-amarronzadas. O reverso é de cor clara.
- **Morfologia microscópicas:** hifas são hialinas, septadas e ramificadas. Dois tipos de esporulação são observadas. Um tipo produz grandes conídios multisseptados (3 a 8 × 11 a 70 μm), denominados macroconídios fusiformes cujo aspecto é de uma "canoa" ou "foice" e são formados sobre células conidiogênicas (fiálides) sustentadas por longos conidióforos com ou sem ramificações. O outro tipo produz conídios pequenos (2 a 4 × 4 a 8 μm) chamados de microconídios que podem ser uni ou bicelulares, ovais a cilíndricos e que nascem em cachos (semelhantemente ao *Acremonium*) ou isoladamente em pequenos ou longos conidióforos.
- **Principais espécies:** *F. falciforme/Acremonium falciforme, F. solani, F.oxysporum, F. subglutinans, F. verticillioides/ F. moniliformes.*

Paecilomyces Bainier, 1907.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é rápida, atingindo a maturidade em três dias. A superfície é plana, pulverulenta a velutina e, usualmente, marrom-amarelado, amarelo-esverdeado, bege e, algumas vezes, lilás, mas nunca verde ou azulado como o *Penicilium*. O reverso é esbranquiçado a amorronzado.
- **Morfologia microscópica:** semelhante ao *Penicillium*, mas as células conidiogênicas (fiálides ou esterigmas) são mais alongadas, afiladas e cônicas. Elas se inclinam lateralmente, não se alinhando segundo o eixo longitudinal do conidióforo. Estas células são formadas sobre conidióforos bem desenvolvidos ou diretamente sobre a hifa vegetativa. Os conídios (2 a 4 μm) são elípticos, cilindricos, oblongos ou em forma de limão e ocorrem em cadeias longas não ramificadas. Clamidósporos podem ser também produzidos. As hifas são hialinas, septadas e muito ramificadas.
- **Principais espécies:** *P. lilacinus/Purpureocillium lilacenum, P.variotii*.

Penicillium Link ex Gray, 1821.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é moderada, atingindo a maturidade em quatro dias. A superfície é, inicialmente, branca, tornado-se, posteriormente, verde-azulado com bordas brancas e pulverulenta ou velutina. O reverso é branco, mas pode ser vermelho ou marrom.
- **Morfologia microscópica:** hifas septadas (1,5 a 5 μm) com conidióforos eretos, ramificaçados (métulas e ramos) ou não. Conídios com 2,5 a 5 μm, catenulados, lisos ou rugosos, globosos ou ovais a elípticos e de coloração verde são formados sobre células conidiais (fiálides) com aspecto de frasco. Toda a esturtura conidial tem uma aparência de "escova" ou "vassoura".
- **Principais espécies:** *P. chrysogenum, P. digitatum, P. comune, P. glaucum*.

Scedosporium sp. (*Pseudoallescheria* sp. e *Lomentospora* sp.).

- **Morfologia macroscópica:** cresce rapidamente em ágar de Sabouraud dextrosado (SDA) e produz uma colônia flocosa, de coloração cinza-escuro ou marrom-acinzentada. No entanto, com o tempo, as colônias tendem a apresentar uma tonalidade mais clara.
- **Morfologia microscópica:** o estado conidial apresenta duas formas: *Scesposorium* e *Graphium*. A forma *Scedosporium* é predominante e apresenta um aleuroconídio solitário ou um aneloconídio que é produzido terminalmente ou lateralmente na hifa

conidiogênica. Os conídios mostram-se de coloração marrom-clara, claviforme ou ovoide, com uma base truncada, medindo 5 a 13 × 3 a 6 μm. Esses conídios são produzidos por uma célula conidiogênica poliblástica. A forma *Graphium* é caracterizada por sinemas (ou corêmios) ramificados ou não, com produção terminal de conídios. A célula conidiogênica de *Graphium* pode mostrar-se anelada. Os conídios produzidos são hialinos, claviformes ou cilíndricos e menores (5 a 7 × 2 a 3 μm) dos que os do tipo *Scedosporium*.

- **Fase sexuada:** o estado teleomórfico encontra-se em *Pseudoallescheria* sp. e *Lomentospora* sp. O fungo é homotálico, produzindo abundantes cleistotécios (100 a 200 μm) de coloração amarronzada. A formação dessas estruturas é iniciada com um ascogônio espiralado que se transforma em um corpo de frutificação maduro em 10 dias. A parede de seu ascocarpo (cleistotécio) é composta por uma camada simples, fina e lisa de células poligonais amarronzadas. Dentro dessas estruturas existem vários ascos. Os ascos (12 a 18 × 8 a 13 μm) são ovais a subglobosos e contêm oito ascósporos (4 a 5 × 7 a 8 μm) marrom-claros, elipsoides e sem uma base truncada. Eventualmente, os ascósporos contêm uma gota de gordura em seu interior.
- **Principais espécies:** *S. apiospermum* [*S. boydii*/*P. boydii*], *S. aurantiacum, P. angusta, P. apiospermum, P. boydii, P. ellipsoidea, S. prolificans*/*L. prolificans.* Eventualmente, *S. prolificans*/*L. prolificans* podem ser enquadrados em feoifomicose, tendo em vista que esses fungos são capazes de produzir melanina.

Scopulariopsis Bainier, 1907.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento é rápida, atingindo a maturidade em cinco dias. A colônia é, inicialmente, branca e glabrosa, tornando-se pulverulenta, marrom-clara a amarelo-amarronzada. O reverso é amarelo-amarronzado com centro marrom.
- **Morfologia microscópica:** hifas hialinas, septadas e ramificadas que, algumas vezes, lembram as do *Penicillium* sp. Os conidióforos são mais simples e menores e as células conidiogênicas podem ser mais cilíndricas e ter um tamanho grande (3 a 4 × 8 a 20 μm). Os conídios também são maiores (4 a 9 μm) e, frequentemente, têm uma forma arredondada ou uma aparência de "limão", com um corte na base, formando um "pescoço curto". A parede é espessa e, nos conídios maduros, são rugosas e espiculadas. Os conídios podem ser produzidos em cadeia sobre os conidióforos ou diretamente sobre a hifa vegetativa em grupos ou isoladamente.
- **Fase sexuada**: *Microascus* sp.
- **Principais espécies:** *S. acremonium, S. brevicaulis*/*S. koningii, S. brumptii*.

Trichoderma Persoon ex Gray, 1821.

- **Morfologia macroscópica:** crescem rapidamente nos meios de cultura. As colônias são flocosas, de coloração branca, mas se tornam verde-amareladas ou verde-escuras, delgadas a velutinas.
- **Morfologia microscópica:** os conídios são unicelulares e hialinos a esverdeados, lisos, globosos ou subglobosos a ovais, sendo produzidos em uma bola viscosa isolada ou em grupos, a partir de fiálides ovaladas ou em forma de garrafa.
- **Principal espécie:** *T. bissettii, T. citrinoviride, T. harzianum*/*Hypocrea lixii, T. longibrachiatum*, *T. orientale.*

- **Métodos não culturais:** podem ser utilizadas a PCR e suas variações, a proteômica de massas em sua versão MALDI-TOF, a detecção do biomarcador panfúngico 1,3-β-D-glucana, a detecção de galactomana, a hibridização *in situ*e imagens radiográficas do pulmão e encéfalo.

Diagnóstico diferencial

A diferenciação deve ser procedida com a feoifomicose, mucoromicose, dermatofitose e outras micoses que apresentem comprometimento tegumentar ou invasivo. Bacterioses e parasitoses devem ser também consideradas.

Prognóstico e tratamento

Em pacientes imunocomprometidos, o prognóstico é quase sempre reservado a ruim. A quiomioterapia antifúngica inclui itraconazol, posaconazol, voriconazol, caspofungina, anidulafungina, micafungina, anfotericina B e suas preparações lipossomais e lipídicas e 5-fluorocitosina associada com poliênos. Importa mencionar que há, contudo, espécies de fungos que exibem respostas variáveis a um ou outro grupo de antifúngicos. Recondicionantes imunológicos têm sido também empregados em terapia combinada.

HISTOPLASMOSE

Etiologia e epidemioloiga

A histoplasmose é uma doença fúngica granulomatosa que compromete primariamente os pulmões, mas que, em decorrência de disseminações hematogências, produz uma grande variedade de condições clínicas. O tamanho do inóculo e o *status* imunológico do hospedeiro parece também condicionar o comportamento do fungo no hospedeiro. O *Histoplasma capsulatum* é o agente etiológico dessa micose sistêmica. Carateristicamente, o organismo apresenta um dirmorfismo termo-nutricional, se desenvolvendo sobre susbtratos naturais como um fungo micelial e, no organismo dos hospedeiros, como um fungo leveduriforme. A morfologia filamentosa é representada por hifas septadas, hialinas e ramificadas com 2 a 5 μm de diâmetro, macroconídios (10 a 20 μm) esféricos a ovalados com ornamentação digitiforme e microconídios (2 a 5 μm) lisos e piriformes. Nos tecidos, o *H. capsulatu* se

apresenta como células de levedura (3 a 5 μm) arredondadas com um único brotamento. A fase sexuada desse fungo pertence ao Filo Ascomycota e é conhecida como *Ajellomyces capsulatus*. O hábitat do *H. capsulatum* está bem estabelecido. Normalmente, solos porosos, ácidos, ricos em conteúdos orgânicos e substâncias nitrogenadas provenientes de guanos de aves e morcegos favorecem o crescimento e a esporulação do fungo. Em ecossitemas naturais, cavernas e deltas de rios, habitados por esses animais, podem conter uma grande quantidade de esporos dispersos no ar. Outras áreas potenciais para o desenvolvimento do fungo são granjas avícolas, silos e construções antigas ou ruínas. A doença tem sido descrita, principalmente, em zonas temperadas e tropicais úmidas com temperatura média de 15 a 20 °C e precipitação pluviométrica entre 800 e 1200 mm. As regiões endêmicas são, principalmente, áreas centrais dos Estados Unidos, Canadá, América Latina e Brasil. Casos autóctones têm sido relatados na África, Europa, Índia e Extremo Oriente e Austrália. A doença pode envolver animais domésticos e selvagens e seres humanos residentes em áreas endêmicas. A histoplasmose ocorrer em qualquer idade e não apresenta predileção por raça. Na idade adulta, o sexo masculino é frequentemente o mais afetado. No entanto, manifestações reumatológicas são mais comuns no sexo feminino. Com relação à fase infantil, diferenças entre os sexos não são observadas. Em geral, as taxas de mortalidade são baixas e a maioria dos casos resolve espontaneamente. Em pacientes imunocomprometidos, todavia, a histoplasmose disseminada progressiva pode apresentar altos percentuais de mortalidade (7% a 23%). A histoplasmose animal é de ocorrência frequente em áreas de endemicidade. Os cães são especialmente suscetíveis, mas outros animais podem ser também acometidos. Sistomatologia pulmonar, cutânea, ocular e disseminada são descritas em veterinária.

Clínica e patologia

Os microconídios da fase micelial do *H. capsulatum* entram no organismo dos hospedeiros preferencialmente pela via respiratória. Por serem de tamanho reduzido, essas estruturas podem chegar até os alveolos pulmonares (pneumonite), transformando-se em elementos leveduriformes dentro de macrófagos (pneumonite). Disseminações pode contiguidade no tecido pulmonar e acometimento de linfonodos hilares e mediastinais, bem como espalhamento hematogênico para fígado, baço e outros órgãos são observados. Essa fase tem duração de duas semanas e não há, ainda, a presença de uma resposta imunológica específica. Após duas ou três semanas, a imunidade celular está estabelecida e o organismo se torna capaz de fazer frente à infecção. A magnitude da exposição ambiental e o estado imunológico dos pacientes influenciam fortemente as manifestações clínicas de histoplasmose. Normamente, um baixo nível de exposição aos elementos do *H. capsulatum* produz uma infecção assintomática, em indivíduos imunocompetentes. Contudo, inóculos mais pesados podem determinar uma sitomatologia aguda. De acordo com a intensidade dos aspectos clínicos, a histoplasmose pulmonar aguda pode apresentar tosse, febre, mal-estar, fraqueza, dores pleural ou retroesternal, dores de cabeça, mialgia, calafrios, náuseas, anorexia e perda de peso. Algumas vezes, aguda artrite ou artralgia associada com eritema nodoso pode ser observada. As manifestações radiológicas mostram infiltrados difusos e nódulos múltiplos e disseminados em ambos os campos pulmonares, efusão pleural e adenopatia hilar. O comprometimento de linfonodos pode levar à formação de um granuloma mediastinal (mediastinite) com síndrome obstrutiva, broncolitíase e pericardite. A histoplasmose pulmonar aguda tende à resolução espontânea em períodos de um a três meses. No entanto, a cura de infiltrados localizados por encapsulação fibrótica e a calcificação pode deixar como sequela nódulos residuais, denominados histoplasmonas. Esses nódulos podem aumentar de tamanho com o tempo, por uma continuada deposição de colágeno e calcificação, e causar erosão de estruturas vitais. A disseminação extrapulmonar da doença aguda em imunocompetentes é frequente, mas, normalmente, cursa de maneira assintomática. Uma forma pulmonar insidiosa e crônica tem sido descrita em pacientes com enfisema, bronquite crônica e outros processos pulmonares obstrutivos crônicos. Comumente, essa forma é observada em pacientes do sexo masculino, cor branca e meia-idade e que foram fumantes por muitos anos. Tosse crônica, expectoração mucopurulenta, hemoptise, dispneia, fadiga, astenia, febre, suor noturno, anorexia e perda de peso são os sintomas presentes. A progressão da doença é caracterizada por cavitação, disseminações a outras áreas pulmonares e formação de fístulas broncopleurais e pneumotórax. Os achados radiológicos exibem infiltrados fibróticos e cavidades apicais em ambos os pulmões e espessamento pleural. O curso natural da histoplasmose pulmonar crônica é a insuficiência cardiorrespiratória. Pacientes imunocomprometidos ou com idade menor que 1 ano ou maiores do que 55 anos podem desenvolver uma forma disseminada sintomática de histoplasmose. Essa entidade clínca compreende desde uma doença extremamente aguda e fatal a uma doença crônica que pode afetar vários órgãos e sistemas, persistindo por meses ou anos. A forma aguda é mais comum em pacientes infantis ou com prometimento imunológico, como aqueles com leucemias, linfomas e Aids. Esses pacientes usualmente exibem febre, prostração, mal-estar, anorexia e perda de peso, além de hepatoesplenomegalia, adenopatias múltiplas, pápulas e úlceras cutâneomucosas e púrpuras. Menos frequentemente, se observam comprometimentos ósseos em pacientes pediátricos e mencingoencefalites em pacientes neutropênicos. As manifestações radiográgicas comprovam a presença de infiltrados intersticiais difusos. A histoplasmose disseminada crônica acomete, tipicamente, indivíduos imunocompetentes com idade entre 40 e 70 anos ou com comprometimento imunológico leve. Acompanhando sintomas respiratórios, esses pacientes apresentam febre, suor noturno, fadiga, anorexia e perda de peso. Lesões mucosas são mais comuns na forma crônica, sendo encontradas em 60% a 90% dos casos. Em geral, essas lesões são únicas, de aspecto nodular ou úlcerovegetantes e se localizam na mucosa bucal, língua, tabique nasal e laringe. Ocasionalmente, alterações de

pele do tipo papulares, pustulosas e ulceradas são observadas na face e no pênis. Infecções no fígado são também comuns, mas a hepatoesplenomegalia é menos pronunciada. Comprometimentos de glândula adrenal podem levar à doença de Addison. Outras mainfestações da histopasmose disseminada crônica são linfoadenopatias, meningites e lesões cerebrais, endocardites e gastrenterites. A radiografia de tórax está alterada em 50% dos casos, mostrando infiltrados intersticiais difusos ou reticulonodulares. Entretanto, os achados radiológicos podem também ser normais ou comprovar infiltrados cavitários ou localizados. A histoplasmose pode estar ainda associada a processos imunologicamente mediados, como a fibrose mediastínica, que ocasiona compressão de grandes vasos e esôfago, e a síndrome ocular presumivelmente relacioanda à histoplasmose, que é uma forma de coriorretinite encontrada em áreas endêmicas.

Além da histoplasmose causada pelo *H. capsulatum*, tradicionalmente, uma doença africana tem sido descrita. Essa outra forma de histoplasmose é causada pelo *Histoplasmaduboisii* e se carateriza por ser restrita, geograficamente, às regiões intertropicais do continente africano. O fungo é também dimórfico, apresentando uma morfologia filamentosa indistinguível daquela observada em *H.capsulatum*. Todavia, a fase leveduriforme é composta por células de leveduras grandes (12 a 15 μm) e aspecto ovalado, de paredes grossas e refringentes e com gemulação única. A doença acomete brancos e negros residentes em áreas endêmicas, envolvendo com maior frequência homens com mais de 30 anos. De maneira geral, essa condição é indolente e pode apresentar melhoras espontâneas. As manifestações clínicas da histoplasmose africana são mais comumente observadas em pele e ossos. O envolvimento pulmonar é esporádico. Lesões cutâneas únicas ou múltiplas podem se apresentar como pápulas e úlceras crostosas, nódulos e abscessos subcutâneos, trajetos sinuosos, retrações e fibrose cicatricial. Os processos osteoarticulares comprometem ossos do crânio, ossos longos, costelas e vértebras e cursam com tumefação e sensibilidade de tecidos moles contíguos, granulomas, abscessos e fístulas subcutâneas. Adenomegalias com linfonodos cervicais, axilares, mesentéricos e inguinais supurados são também frequentes. As manifestações pulmonares, quando presentes, não têm um carácter de pneumopatias agudas. A radiologia mostra infiltrados pulmonares interticiais com nódulos miliares. Nas formas crônicas, infiltrados e cavidades apicais são mais comuns. No trato gastrintestinal, placas de Peyer podem ser acometidas, produzindo úlceras necróticas e perfurações de peritônio. Hepatoesplenomegalias podem ser encontradas nas formas disseminadas graves.

Diagnóstico laboratorial

No diagnóstico da histoplasmose, tem sido utilizados, classicamente, métodos culturais, técnicas micopatológicas, bem como testes sorológicos para a detecção de anticorpos.

- **Exame direto e histopatológico:** o exame direto apresenta um baixo rendimento com pus e escarro, não sendo uma prova adequada ao diagnóstico presuntivo de histoplasmose. Assim, o material clínico deverá ser corado por uma técnica hitopatológica para a análise microscópica. Gromori-Grocott (prata) e ácido periódico de Schiff (PAS) para cortes histológicos e Giemsa ou Wright para distensões sanguíneas podem revelar elementos leveduriformes ovoides (2 a 4 μm), com um brotamento em sua porção menor, extra ou intracelulares em macrófagos e células gigantes. Uma espécie de cápsula hialina ao redor da célula de levedura pode ser observada e representa, na verdade, a parede celular e não uma estrutura capsular. No interior do patógeno é possível, ainda, visualizar uma grande área vacuolar e uma massa protoplasmática corada de vermelho na extremidade mais ampla da célula. Outras estruturas leveduriformes e parasitárias, elementos teciduais, corpos estranhos e artefatos podem mimetizar o *H. capsulatum* no hospedeiro.
- **Cultura:** O *H. capsulatum* pode ser isolado de amostras clínicas empregando-se ágar de Sabouraud dextrosado (SDA), ágar infusão de cérebro-coração (BHIA) ou ágar sangue acrescidos de antimicrobianos, quando forem obtidos de sítios não estéreis, ou, ainda, ágar extrato de levedura-fosfato. A incubação das culturas deve ser realizada a 25 a 30 °C, por um período de até 12 semanas. Em temperaturas elevadas, o *H. capsulatum* se mostra sensível ao cloranfenicol e à cicloheximida dos meios de cultura primários. Uma morfologia filamentosa pode estar presente após o período de incubação. Como outros fungos contaminantes e monomórficos (*Chrisporium* sp./*Renispora falvissima*, *Sepedonium* sp.) podem apresentar uma morfologia filamentosa similar ao *H. capsulatum*, a demonstração da fase leveduriforme deve ser procedida. Para tanto, subscultivos da cultura primária filamentosa devem ser realizados para ágar sangue ou ágar BHI suplementado com sangue de carneiro e incubados a 37 °C, por 2 a 4 semanas. Para hemocultura, o sistema de lise por centrifugação tem apresentado melhor rendimento. A prova do exoantígeno permite a indentificação do fungo em 48 a 74 horas.

Histoplasma capsulatum Darling, 1906.

- **Fase filamentosa:**
  - **Morfologia macroscópica:** cresce lentamente, atingindo a maturidade em 15 a 20 dias ou, então, em 12 semanas. Inicialmente, as colônias apresentam uma superfície cerosa e coloração branca a bege ou marrom. Com a maturidade, as colônias produzem um micélio aéreo que dá um aspecto algodonoso ou pulverulento. As colônias brancas (ou beges) algodonosas são chamadas de "A" (albinas) e as marrons pulverulentas, de "B" (marrom). Ambos os tipos podem ser isolados do mesmo paciente. O *H. duboisii* produz colônias indistinguíveis de *H.capsulatum*.

- **Morfologia microscópica:** as hifas são hialinas, septadas e ramificadas e dão origem a pequenos e estreitos conidióforos que se estendem em ângulos retos. Ocasionalmente, os conidióforos podem formar conidióforos secundários laterais. Alguns conidióforos apresentam uma dilatação logo abaixo do conídio que está sendo formado. Dois tipos de conídios são produzidos na extremidade ou lateralmente aos conidióforos ou, ainda, diretamente sobre a hifa vegetativa. Um tipo é grande (8 a 15 μm), esférico, oblongo ou piriforme, de paredes espessas revestidas externamente por projeções digitiformes. Esse conídio é chamado de macroconídio tuberculado ou mamilado ou estalagmosporo. O outro tipo, denominado microconídio, é pequeno (2 a 4 μm), oval e suas paredes são lisas ou finamente rugosas. Ambos os tipos de conídios são, em geral, formados isoladamente, mas podem, algumas vezes, ser produzidos em pequenas cadeias de 2 a 3 esporos. O grau de esporulação varia grandemente de isolado para isolado. Colônias do tipo "B" são mais delgadas e produzem mais macroconídios e esparsas hifas aéreas. Contudo, as colônias do tipo "A" tendem a ser mais espessas e a produzir maior número de microconídios. Alguns isolados podem produzir macroconídios de paredes lisas, sem as projeções típicas, em considerável quantidade. Esses macroconídios de paredes lisas são mais frequentemente encontrados em colônias do tipo "A", que produzem espesso material micelial. Macroconídios típicos podem não ser produzidos em isolamento primário, porém, após alguns subcultivos, esses podem ser observados. Isolados obtidos de pacientes submetidos à terapia antifúngica, com frequência, não produzem macroconídios tuberculados.

- **Fase leveduriforme:**
  - **Morfologia macroscópica:** a conversão à fase leveduriforme requer 2 a 3 semanas ou mais. As colônias são lisas a rugosas, cerosa, glabras, mas nunca mucoides. Inicialmente, apresentam-se cremes ou beges, tornando-se, com o tempo, branco pardacento a cinza claro.
  - **Morfologia microscópica:** as células de levedura gemulantes são ovais ou de tamanho irregular, medem 2 a 5 μm de diâmetro e têm uma base de união estreita (0,2 a 0,3 μm) entre a célula-mãe e a célula-filha. Em *H. duboisii*, as células de levedura gemulantes são ovais, medindo 7 a 15 μm; têm paredes espessas e base de inserção larga entre a gêmula e a célula mãe. *Histoplasmaduboisii* lembra o *B. dermatitidis*, todavia, as células do *H. duboisii* são mais ovaladas e apresentam uma base de inserção menor do que a do *B. dermatitidis*.

- **Métodos não culturais:** a detecção de anticorpos anti-*Histoplama capsulatum* tem sido classicamente realizada pelas provas de imunodifusão dupla e fixação de complemento. A histoplasmina é o antígeno normalmente empregado na prova de imunodifusão. Este antígeno é obtido da fase micelial do *H. capsulatum* e contém duas frações específicas do fungo denominadas H e M. Por sua vez, na prova de fixação de complemento, são utilizados antígenos de fase micelial e leveduriforme. De maneira geral, a fixação de complemento apresenta maior sensibilidade que a imunodifusão. Contudo, reações cruzadas podem ocorrer com blastomicose e coccidoidomicose. A presença de antígenos circulantes de natureza polissacarídica pode ser detectada em sangue, urina, líquor e lavado alveolar por radioimunensaio e ensaio imunoenzimático, fornecendo um rápido diagnóstico de histoplasmose. Reações cruzadas com *B. dermatitidis*, *Coccidioides imitis/Coccidioides posadasii*, *H. duboisii*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Penicillium* sp. podem gerar falso-positivos. Testes cutâneos com histoplasmina não são recomendados para fins de diagnóstico, em decorrência das altas taxas de reações positivas nas áreas endêmicas, duração variável da resposta e interferência com outras provas sorológicas. A radiografia de tórax pode se mostrar normal ou alterada. Dependendo da forma da histoplasmose, podem ser visualizados nódulos mediastinais e hilares, infiltrados difusos com padrão nodular, reticulonodular ou miliar, histoplasmonas, cavitações ocasionais e rara efusão pleural. A tomografia computadorizada é adequada para a avaliação de fiborose mediastinal, broncolitíase, abscessos cerebrais e envolvimento de suprarrenal, bem como nódulos calcificados (histoplasmonas). A ressonância magnética é especialmente útil para o diagnóstico de obstrução vascular.

Diagnóstico diferencial

A histoplasmose pulmonar aguda deve ser distinguida de penumonites ocasionadas por espécies de *Mycoplasm*a, *Legionella*, *Coxiella*, *Chlamidia,* além de gripe e tuberculose miliar. A doença crônica pode mimetizar Granulma de Wegener e infecções pulmonares por *C. immitis/C. posadasii*, *Mycobacterium* sp., complexo *Sporothrix schenckii*. Outros processos a considerar são o carcinoma de célula escamosa, sífilis primária ou terciária, para coccidioidomicose e tuberculose. Na forma disseminada, a diferenciação deve ser feita com leishmanise visceral, leucemias e linfomas.

Prognóstico e tratamento

Dependendo da forma clínica, o prognóstico pode sofrer alterações. De maneira geral, quando o paciente é imunocompetente, a doença se resolve sem maiores incidentes. O tratamento segue, basicamente, o mesmo protocolo praticado nas doenças fúngicas sistêmicas. Assim, anfotericina B e suas preparações lipossomal e lipídicas, miconazol, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol são as drogas utilizadas. Ocasionalmente, tratamentos cirúrgicos podem ser requeridos, como a lobectomia nos histoplasmonas e o desbridamento das fibroses mediastínicas.

LOBOMICOSE

Etiologia e epidemiologia

A lobomicose se caracteriza por uma infecção de natureza crônica progressiva que acomete o tecido cutâneo e subcutâneo, apresentando lesões de aspecto tumoral. Dentre os sítios anatômicos comprometidos, ombros e pavilhão auricular são preponderantes. O agente etiológico dessa condição é o fungo *Lacazia loboi*, que comumente se apresenta no tecido tegumentar como células leveduriformes globosas ou elípticas isoladas ou em pequenas cadeias ramificadas. Por não ser cultivável, suas características ecológicas são amplamente desconhecidas. Todavia, sabe-se que a doença é mais prevalente em países da América Latina, tendo na região amazônica e no centro-oeste do Brasil, além do Suriname, as principais áreas de endemicidade. Outras regiões relatadas incluem México, Honduras, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Colômbia, Bolívia, Peru e Europa. A lobomicose parece afetar mais os indivíduos do sexo masculino com idade entre 30 e 40 anos que trabalham em áreas rurais ou agrícolas. Animais marinhos como golfinhos também podem ser acometidos.

Clínica e patologia

Normalmente, a infecção tem início após a implantação traumática de *Lacazia loboi* no tecido cutâneo, subepidérmico e subcutâneo, em decorrência de ferimento com material vulnerante de natureza vegetal ou picada de insetos. Apesar de controverso, há relatos na literatura sobre a transmissão entre animais superiorres infectados e os seres humanos. A transmissão entre humanos tem sido obtida apenas experimentalmente. A doença é assintomática, mas pode se mostrar pruriginosa, com sensação de queimação ou dor e determinar mal-estar. A lobomicose é um processo indolente e de curso insidioso que tende a formar lesões queloidiformes, nodulares e verrucosas, bem como placas com superfícies crostosas e ulceradas. Atrofia, hiperqueratose, hiper ou hipopigmentação ou paraceratose são observadas na pele lesionada. Não há, contudo, evidências de necrose ou supuração. As áreas mais acometidas do corpo são face, pescoço, pavilhão auricular, membros superiores e inferiores, nádegas e região lombossacral. Lesões deformantes na região da face têm sido relatadas. Algumas vezes, linfonodos regionais podem ser implicados. Frequentemente, as adenopatias são mais observadas em lesões recentes.

A lesão inicial é representada por pápulas e pequenos nódulos circunscritos e consistentes de coloração rósea ou acinzentada que, ao aumentarem de tamanho e coalecerem, produzem grandes áreas multilobuladas. Além das áreas próximas, esse crescimento pode ocorrer também em regiões não contíguas e distantes do organismo. O espalhamento da doença se dá por extensão periférica, autoinoculação em decorrência de prurido ou por disseminação vascular linfática ou hematogênica. A disseminação visceral tem sido pouco descrita. Grandes lesões endurecidas com bordos lobulados e áreas superficiais pouco comprometidas, lisas e brillhantes devido a processos atróficos e com alteração na pigmentação podem surgir como resultado da progressão da micose. Certas lesões podem, ainda, se apresentar totalmente lobuladas ou muito rugosas e com fissuras. Não há fixação em músculos e ossos subjacentes. Classicamente, cinco tipos principais de lesão têm sido descritos: tipo infiltrativo, queloidiano, gomoso, verrucoso e ulcerativo. O tipo infiltrativo está associado a lesões papulo-nodulares, por isso, é mais característico das fases iniciais da lobomicose. O tipo queloidiano é representado por massas duras e fibróticas. O tipo gomoso é determinado por lesões tegumentares profundas. O tipo verrucoso é geralmente decorrente de lesões antigas e crônicas. O tipo ulcerativo apresenta perda de tecido e, com frequência, está relacionado a infecções bacterianas secundárias. Nesse último, lesões deprimidas e escavadas podem permanecer como sequelas. Histologicamante, a lobomicose produz um granuloma histiocítico subepidérmico com macrófagos e células gigantes contendo abundantes elementos fúngicos.

Diagnóstico laboratorial

- **Exame microscópico direto e histopatologia:** pelo fato de *Lacazia loboi* ainda não ter sido isolada em cultura, o exame direto dos espéciens clínicos e o estudo histopatológico são os principais instrumentos para o diagnóstico laboratorial. A avaliação microscópica com KOH a 10% a 20% revela a presença de grande quantidade de estruturas ovaladas ou em forma de limão, de paredes duplas, com tamanho de cerca de 9 μm e semelhantes às células parasitárias de *Paracoccidioides brasiliensis*. No entanto, diferentemente *de P. brasiliensis*, as células filhas e parentais exibem o mesmo diâmetro. Os elementos leveduriformes de *L. loboi* são gemulantes, capazes de formar pequenas cadeias de células e ramificar ou manter uma formação em dupla, produzindo uma imagem tecidual conhecida como "ampulheta". Em preparações histológicas com hematoxilina e eosina (HE), o fungo se cora pobremente, todavia, um material eosinofílico homogêneo pode ser visualizado ao redor da célula. Corpos asteroides radiados e eosonofílicos podem ser detectados, confirmando a ocorrência do fenômeno de Splendore-Hoepli. Pela coloração de Gridley, *L. loboi* apresenta um citoplasma amarelado com um núcleo enegrecido e parede celular rosácea. Um material granular associado à parede celular pode ser também observado. Com a técnica do ácido periódico de Schiff (PAS), pode ser visualizada uma massa protoplasmática retraída e fortemente corada com evidente material granular. Uma maior definição das estruturas leveduriformes e seus limites pode ser conseguida com a coloração pela prata (Gromori-Grocott). Nessa preparação histológica, o tubo de conexão entre a célula filial e parental é melhor demonstrado.

  Lacazia loboi Taborda, Taborda *et* McGinnis, 1999.
- **Taxonomia:** *L. loboi* é uma espécie com identidade bem definida e muito proximamente relacionada ao *Paracoccidieoides brasiliensis* e a outros fungos dimórficos da ordem Onygenales (*Blastomyces dermatitides, Emmonsia parva, Histoplasma capsulatum*).

- **Tecido:** Elementos leveduriformes globosos a subglobosos (5 a 11 μm) com gêmulas unidas por uma base de inserção estreita (tubo de conexão). As células podem se apresentar isoladas e/ou em cadeias de comprimento variável e com diferentes graus de ramificação. A separação das células adjacentes ocorre por aumento da espessura da parede celular, que contém constitutivamente melanina.

Diagnóstico diferencial

Clinicamente à lobomicose, pode apresentar aspecto de queloide associado a queimaduras ou traumatismos, melanomas, psoríases, piodermites, hanseníase, leishmaniose, paracoccidioidomicose, cromoblastomicose ou esporotricose, quando há espalhamento linfático. Todavia, para o diagnóstico diferencial, a idade das lesões deve ser considerada. Processos mais recentes podem ser semelhantes a queloides, fibrossarcomas ou dermatossarcomas. No caso de lesões mais antigas, essas são semelhantes, entre outras, à cromblastomicose e micetoma.

Prognóstico e tratamento

A lobomicose tem um prognóstico bom a excelente. A cirurgia, criocirurgia e eletrocoagulação são os procedimentos de melhor resposta, principalmente para lesões limitadas, tendo em vista a quimioterapia antifúngica se mostrar inefetiva. As drogas que podem ser empregadas incluem ocetoconazol, itraconazol, posaconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B. Não há tendência à cura espontânea e recidivas são frequentes. Lesões jovens e antigas convivem no mesmo paciente.

MICROSPORIDIOSES

Etiologia e epidemiologia

Microsporidioses são infecções normalmente oportunistas, determinadas por distintos gêneros de microsporídios. O termo *microsporídio* compreende mais de 1.400 espécies, incluídas em 170 gêneros, que pertencem ao Filo Microsporidia. Os principais gêneros relacionados à doença humana e animal são *Amblyospora* sp., *Anncaliia* sp., *Brachiola* sp., *Culicospora* sp., *Encephalitozoon* sp., *Endoreticulatus* sp., *Enterocytozoon* sp., *Glugea* sp., *Microsporidium* sp., *Nosema* sp., *Nucleospora* sp., *Parathelohania* sp., *Pleistophora* sp., *Septata* sp., *Spraguea* sp., *Thelohania* sp., *Trachipleistophora* sp., *Vittaforma* sp. e *Visvesvaria* sp. Dentre esses gêneros, existem 14 mais prevalentes na doença humana, com destaque para os gêneros *Encephalitozoon* sp. e *Enterocytozoon* sp. Esses organismos eucariontes, unicelulares e parasitas obrigatórios foram, a princípio, classificados como protozoários, mas, atualmente, foram incluídos no grupo dos fungos pela observação da presença de quitina na parede celular, ocorrência de mecanismo mitótico idêntico aos dos Ascomycota e Basidiomycota, cuja divisão nuclear se dá sem dissolução da membrana dos núcleos, identificação do gene HSP70 (*Heat Shock Proteins*) mitocondrial e análises filogenéticas dos genes da α e β-tubulina, genes da TBP (*TATA-Box Binding Protein*), genes da subunidade maior da RNA Polimerase II, genes dos fatores de elongação e translocação EF- α e EF-2 e genes da glutamil tRNA sintetase. Apesar das características biológicas aproximarem os microsporídios dos fungos, esses têm sido considerados, na realidade, como um "grupo-irmão" e não como verdadeiros fungos. Em decorrência de seus aspectos peculiares, todavia, geneticamente os microsporídios têm sido considerados ancestrais ou intermediários entre os seres procariontes e eucariontes.

Ultraestruturalmente, esses microrganismos possuem uma camada externa proteica (camada exospórica), uma interna de natureza quitinosa (camada endospórica) e uma membrana citoplasmática que reveste toda a estrutura do esporo, conferindo grande resistência. Contidos no esporoplasma, estão o núcleo, os ribossomas, o retículo endoplasmático e o vacúolo posterior. Os microsporídios exibem um genoma extremamente reduzido e compacto, e seus núcleos podem ser tanto monocarióticos quanto dicarióticos. No esporoplasma, os núcleos dicarióticos se posicionam muito proximamente um do outro e funcionam como uma única unidade nuclear. Em estreita ligação com o retículo endoplasmático, e apresentando um arranjo regular, existem muitos ribossomos que lembram aqueles dos organismos procariontes, cujo tamanho é cerca de 70S. Esporos maduros, apesar de não possuírem mitocôndrias, apresentam organelas crípticas com membrana dupla, derivadas das estruturas mitocôndrias, denominadas mitossomos. Os mitossomos estão relacionados à síntese de complexos de ferro-enxofre, cuja função química, dentre outras, é a transferência de elétrons, gerando ATP, como na respiração celular, porém sem a fosforilação oxidativa. Esses fungos não apresentam um aparelho de Golgi típico, mas sim membranas lamelares e vesiculares semelhantes às de Golgi, chamadas de polaroplasto, que se localizam na parte anterior do esporo. Um conspícuo filamento tubular polar com uma porção reta e outra espiralada em hélice tem sido reconhecido nesses organismos. Além desse elemento filamentoso, uma estrutura frontal, com um aspecto de "cogumelo", denominada disco de ancoragem, tem sido também observada. Apicalmente, através de sua porção reta, o túbulo polar pode se ligar a esse disco de ancoragem. Nessa região, a parte reta do túbulo polar e o disco de ancoragem são envolvidos pelo polaroplasto. A porção espiralada do túbulo polar, por sua vez, continua para a região posterior do esporo, formando várias alças no interior do esporoplasma. O número de voltas do filamento polar, o seu arranjo espacial relativo e o ângulo de inclinação da hélice permitem diagnosticar a espécie de microsporídio. Nessa área posterior do esporo, se encontra um grande vacúolo que parece funcionar como um peroxissoma. Como ocorre com as mitocôndrias e os hidrogenossomas, peroxissomas estão ausentes nesses microrganismos.

O ciclo de vida dos microsporídios compreende três fases principais. A fase infectante ou ambiental, representada pelos esporos; a fase proliferativa, merogônica ou esquizogônica, e a fase esporogônica ou de formação de esporos. Além disso, a divisão celular pode ocorrer tanto sexuada quanto assexuadamente. O esporo é a única fase do ciclo vital desses organismos que ocorre fora da célula do hospedeiro. Os

esporos apresentam paredes espessas, pequenas dimensões (1 a 12 μm) e morfologia oval ou piriforme. Um aspecto notável é a presença do aparato de extrusão, formado pelo túbulo polar, disco de ancoragem, poroplasma, retículo endoplasmático e vacúolo posterior. Ao entrar em contato com o hospedeiro adequado, uma série de eventos ocorre no meio externo, antes da invasão do parasita na célula. A ativação ou germinação do esporo se caracteriza pela quebra da organização e da compartimentalização do esporoplasma. Uma mudança na pressão osmótica e no pH do esporo resulta no influxo de água e intumescência do polaroplasto. O aumento do tamanho do polaroplasto induz a evaginação inicial do filamento tubular, pela porção anterior do esporo. Ao mesmo tempo, o vacúolo posterior se expande e empurra para fora o esporoplasma e o núcleo, através do filamento tubular externalizado. Durante a descarga do material infectante, o disco de ancoragem segura o filamento tubular na posição correta de extrusão. O mecanismo pelo qual o túbulo polar penetra na célula do hospedeiro parece incluir uma fagocitose, que ocorre quando o ápice do esporo entra em contato com a membrana plasmática da célula do hospedeiro. Dessa forma, o túbulo polar descarrega diretamente o esporoplasma no citoplasma da célula-alvo. Esse esporoplasma é circundado por uma membrana secretada pelo polaroplasma. Com a entrada na célula, inicia-se, então, a fase proliferativa do ciclo de vida, caracterizada pela ocorrência da merogonia, período em que o parasita aumenta massivamente o seu número, com a formação, em grande quantidade, de células designadas de merontes. Os merontes são células arredondadas que apresentam uma membrana típica, uma grande região nuclear com núcleos simples ou duplos, um retículo endoplasmático pouco desenvolvido e muitos ribossomos dispersos no citoplasma ou em associação com o retículo endoplasmático e com a membrana nuclear. Nessa fase, a divisão celular ocorre por repetidas fissões binárias (merogonia) ou por fissão múltipla (esquizogonia). Quando a divisão nuclear (cariocinese) ocorre sem a concomitante divisão do citoplasma (citocinese), é formada uma célula com múltiplos núcleos, denominada plasmódio merogonial. Essas células multinucleadas, entretanto, num outro momento do ciclo biológico fúngico, também podem sofrer citocinese. Os merontes podem se desenvolver de forma direta no citoplasma do hospedeiro e em vacúolos parasitóforos ou vesículas esporóforas, formadas por uma membrana simples, secretada pelo hospedeiro. Esses elementos estão, ainda, imersos numa substância amorfa, produzida pelo próprio parasita, ou envolvidos pelo retículo endoplasmático do hospedeiro. A fase esporogônica tem início quando os merontes se convertem em esporontes, passando a exibir um citoplasma mais denso, pela formação progressiva de diversas organelas intracelulares. Os esporontes podem se dividir, formando dois ou mais esporoplastos. Contudo, esses esporontes podem continuar se dividindo por fissão binária, sem a ocorrência de citocinese, produzindo, à semelhança dos merontes, células multinucleadas, conhecidas como plasmódios esporogoniais. Esses plasmódios esporogoniais, posteriormente, também podem se dividir por plasmotomia. Os esporoplastos formados amadurecem e se transformam em esporos. Nesse ponto, não há mais divisões celulares. O amadurecimento dos esporoplastos é caracterizado pelo espessamento da parede celular e formação de suas diversas camadas, bem como pela síntese e desenvolvimento de ribossomos, retículo endoplasmático liso e rugoso, complexo de Golgi atípico, vacúolo posterior, filamento tubular com sua parte reta e helicoidal, polaroplasto vesicular e lamelar, e aparato de extrusão. A polarização das organelas do esporoplasto finaliza a formação do esporo. A grande quantidade de esporos formados acaba por romper a célula parasitada, liberando essas estruturas no meio extracelular. Dessa forma, inicia-se, novamente, o ciclo evolutivo do microrganismo.

A epidemiologia da microsporidiose varia com o *status* imunológico dos pacientes e com a espécie de fungo envolvida. Em indivíduos imunocompetentes, cursa, principalmente, como uma diarreia que se resolve e, em imunocomprometidos, como uma diarreia crônica. Nos indivíduos com Aids, a prevalência varia de 7% a 50%, com uma média geral de 15%. A distribuição é mundial, com menção a países como Alemanha, Austrália, Brasil, Canadá, Estados Unidos, França, Inglaterra, Itália, Holanda, Porto Rico, Su***íça*** e Zâmbia. Antes da instituição da HAART, a prevalência da microsporidiose era mais alta entre os pacientes com HIV que apresentavam contagem de $CD4^+$ em torno de 100 células/mm^3 de sangue. Em indivíduos não infectados com HIV, a taxa varia de 1,3% a 22%, podendo chegar até a 80%. Entre os indivíduos susceptíveis, estão incluídos doadores de sangue, mulheres grávidas, transplantados de órgão, usuários de lentes de contato, trabalhadores em matadouros, mateiros e criadores de cães. Em viajantes, oscila de 3,3% a 10% e, em crianças diarreicas ou não e desnutridas, pode variar de 5,9% a 17,4% e, em idosos, pode chegar até a 17,02%.

A observação de que os microsporídios são ubiquitários e a infecção é amplamente distribuída, sugere a existência de muitas fontes e modos de transmissão. As principais fontes de microsporídios são a água, alimentos, insetos e animais (cães, gatos, raposas, equídeos, ruminantes, suínos, aves, coelhos e outros roedores, guaxinins, primatas não humanos e peixes). A presença de microsporídios no trato respiratório, intestinal e urogenital e próstata de indivíduos infectados, e a excreção de esporos na urina e fezes, indicam que a transmissão horizontal inter-humana é possível. Esta ocorre por rotas que incluem transmissão fecal-oral, oral-oral, inalação de aerossóis contaminados, ingestão de alimentos e água contaminados e traumatismo de pele e mucosas, o que permite que os parasitas penetrem nos tecidos por invasão direta, através do epitélio. Riscos de transmissão horizontal estão ainda associados a práticas homossexuais e ***à*** transmissão venérea, uso de drogas endovenosas, exposição à água de forma ocupacional ou recreacional (piscinas, banheiras de hidromassagem) e, ainda, por domicílio próximo a sistemas de distribuição de água potável. Além disso, a água contaminada pode entrar em contato com os alimentos durante o seu preparo ou na irrigação de culturas agrícolas. Solos, valas, fossas e esgotos podem transferir para a água os esporos fúngicos que, por serem extremamente resistentes, sobrevivem longo tempo

em meio hídrico e no ambiente, em geral. A contágio horizontal é a forma mais comum de transmissão da microsporidiose. A infecção de conjuntiva, contudo, parece implicar uma autoinoculação. A transmissão vertical, por sua vez, tem lugar na linhagem ou descendência do hospedeiro. Os fungos são passados de geração em geração, podendo ser transmitidos por via transplacentária (vertebrados) ou transovariana (invertebrados), onde o parasita passa da mãe para o zigoto, pelo citoplasma do gameta feminino. Essa transmissão vertical tem sido descrita em animais carnívoros, cavalos, macacos e roedores. No homem, ainda é controversa. Normalmente, a transmissão é unioparental, sendo a mãe, de fato, a responsável pela infecção à prole. Em decorrência do reduzido tamanho do gameta masculino, é pouco provável que esse contribua verticalmente. A transmissão zoonótica também tem sido considerada, já que seres humanos têm sido infectados com espécies que infectam animais domésticos, de produção e selvagens. A transmissão por vetores, a partir da picada de abelhas, vespas, marimbondos e mosquitos tem sido relatada. Das glândulas salivares e intestinais e segmentos musculares de insetos foram isolados fungos, o que corrobora com os relatos de transmissão vetorial.

Clínica e patologia

Os microsporídios causam um grande número de infecções localizadas ou disseminadas. Os aspectos clínicos dependem do modo de transmissão, do tipo de espécie infectante e do *status* imunológico do paciente e sua capacidade de responder à infecção fúngica. Em humanos, três grupos principais de pacientes têm sido identificados e associados a espécies fúngicas e a tipos lesionais específicos, quais sejam: pacientes imunocomprometidos HIV-positivos, pacientes imunocomprometidos HIV-negativos e pacientes imunocompetentes.

Em imunocomprometidos infectados com HIV, em geral, são observadas infecções intestinais crônicas, cursando com perda de peso e dor abdominal. Nos imunocomprometidos por outras causas (transplantados de medula óssea e órgãos sólidos), são frequentes as infecções disseminadas com envolvimento cerebral, ocular, respiratório superior e inferior, cardíaco, geniturinário, hepático, ósseo e muscular, tegumentar, bem como gastrointestinal. Doença disseminada, com estado de emaciamento e enfraquecimento geral, tem sido também relatada. Crianças primariamente infectadas e malnutridas desenvolvem uma diarreia persistente. Normalmente, em pacientes imunocompetentes, as microporidioses são infecções assintomáticas ou intestinais agudas e circunscritas com cerca de 2 a 3 semanas de duração. Naqueles pacientes sem alterações imunológicas, os aspectos clínicos mais notáveis são diarreia autolimitada, diarreia dos viajantes, convulsões, queratite e úlcera de córnea. Interessante notar que animais carnívoros desenvolvem respostas hiperimunes, resultando na formação de imunocomplexos e doença renal.

Diagnóstico laboratorial

Atualmente, muitos métodos para a detecção e diferenciação de espécies de microsporídios estão disponíveis. Dentre esses métodos, podem ser destacados a microscopia eletrônica de transmissão, microscopia óptica, citologia, histopatologia, ensaios de imunofluorescência, que empregam anticorpos policlonais ou monoclonais, cultura de células e biologia molecular. Pelo fato das microsporidioses apresentarem variações em seus aspectos clínicos e epidemiológicos, a utilização de diferentes métodos de diagnóstico aumenta as chances de identificação dos agentes fúngicos. Como o acometimento de múltiplos sítios anatômicos não é incomum nessas infecções, mais de um *espécimen* clínico deve ser analisado. Na doença disseminada, os *espécimens* de urina devem ser sempre avaliados.

A coleta e o transporte dos *espécimens* clínicos são etapas críticas para o sucesso do diagnóstico. As amostras de fezes ou descargas intestinais podem ser enviadas a fresco ou preservadas em formol 5% a 10%. Da mesma forma, as amostras de urina podem ser enviadas *in natura* ou fixadas. Adequadas para o diagnóstico das microsporidioses são também as amostras de bi**ó**psia de órgãos e tecidos diversos. Outras amostras empregadas no diagnóstico são bile, escarro, lavado broncoalveolar, secreções nasais e paranasais, líquor, punção de gânglios e abscessos, raspados de córnea e *swabs* de mucosas. As amostras transportadas a fresco são adequadas para a cultura de células e a biologia molecular; aquelas fixadas em formol são recomendadas para os estudos de histopatologia, e aquelas em gluteraldeído são usadas na microscopia eletrônica.

Relativamente aos agentes fúngicos e os hospedeiros acometidos, *Brachiola vesicularum*, *Encephalitozoon hellen*, *Trachipleistophora hominis* e *T. anthropthera* têm sido isolados de pacientes infectados com HIV, e *Nosema ocularum, B. (Nosema) connori, Vittaforma (Nosema) cornea, Microsporidium africanus, M. ceylonesis* têm sido identificados nos outros tipos de pacientes, ou seja, em imunocomprometidos não infectados com HIV e imunocompetentes. *Brachiola* (*Nosema*) *algerae*, *E. cuniculi*, *E.* (*Septata*) *intestinalis*, *Enterocytozoon bieneu* e *Pleitosphora* sp., contudo, têm sido isolados indistintamente em todos os grupos de hospedeiros humanos.

- **Microscopia eletrônica de transmissão:** a técnica é considerada *gold standard* para a determinação ou confirmação da espécie de microsporídio e para a classificação taxonômica de novas espécies. As características ultraestruturais que são utilizadas para a diferenciação dos microsporídios incluem configuração nuclear, arranjo do filamento polar, número de alças da porção espiraladas do filamento polar, disco de ancoragem, interface parasita-hospedeiro (presença ou ausência de vacúolo parasitóforo ou vesícula esporófora) e fase do desenvolvimento do esporo. Essa técnica é mais sensível quando se emprega fluidos corporais do que biópsia. A diferenciação das espécies de microsporídios é mais difícil em biópsia porque a fase proliferativa está ausente ou é rara nesse tipo de amostra. A detecção do organismo em biópsia, todavia, é muito mais específica. Por ser laboriosa, onerosa e requerer conhecimentos mais especializados, a técnica de microscopia eletrônica não está disponível nos laboratórios de rotina.

- **Microscopia óptica:** o diagnóstico de microsporidiose é amplamente realizado pela observação microscópica dos agentes em amostras de fezes, urina, fluidos biológicos e tecidos. Apesar de ser possível determinar a ocorrência de infecção, a diferenciação de gênero e/ou espécie é deficiente por essa técnica. Os esporos dos microsporídios podem ser detectados citologicamente nos *espécimens* clínicos, a partir da utilização de diferentes colorações; no entanto, aquelas de rotina, como Giemsa e Gram, por não permitir a diferenciação dos microsporídios de outras estruturas presentes nos tecidos, podem embutir certa dificuldade na observação microscópica. Os métodos de coloração mais adequados são aqueles que utilizam o corante cromotrope 2R como base. Dentre as várias modificações dessa técnica, destacam-se a coloração tricrômica, onde os fungos apresentam uma coloração rosa avermelhada escura e refringente com a presença de uma área mais clara. Ao se associar ***à*** coloração de Gram com o cromotrope 2R (coloração Gram-cromotrope a quente), os microsporídios exibem uma coloração violeta escuro. Técnicas de fluorescência também têm sido aplicadas para o diagn***ós***tico. Os corantes branco de calcoflúor e Uvitex 2B produzem fluorescência para o material fúngico. Nesse tipo de coloração, fluorocromos reagem especificamente com a quitina do endósporo. A maior desvantagem é necessidade de um microscópio de fluorescência para a execução da técnica e a ocorrência de fluorescência em qualquer elemento de origem fúngica na amostra. Histopatologicamente, vários métodos estão também disponíveis para o diagnóstico de microsporidiose. No material fixado em formol e parafinado, os esporos podem ser corados de púrpura, vermelho ou violeta pelas colorações de hematoxilina e eosina (HE), Giemsa, Ziehl-Neelsen, ácido de periódico de Schiff (PAS), Gram modificado por Brown-Breen e Gram modificado por Brown-Hopps. As colorações cuja base é a prata, como Gromori-Grocott e Warthin-Starry, coram os fungos em negro ou marrom-escuro. Pela coloração de Warthin-Starry, é possível diferenciar os esporos de microsporídios dos lisossomas e debris apoptóticos dentro do enterócito. A técnica de cromotrope 2R e suas modificações (coloração tricômica modificada por Ryan-Blue, coloração tricômica modificada por Weber-Green, coloração tricômica de Gromori modificada por Wheatley, tricrômica ácido-resistente) podem também ser utilizadas na histopatologia da microsporidioses, sendo os esporos corados de rosa a púrpura.
- **Cultura de células e modelo animal:** alguns microsporídios que infectam seres humanos têm sido cultivados, por curtos períodos de tempo, em diferentes tipos de células animais e humanas (células renais de coelhos, macacos e cão, e fibroblastos fetais de pulmão humano). Apesar de não ser relevante para o diagnóstico de rotina, a cultura desses organismos tem sido empregada para determinar a eficácia de agentes antimicrobianos, bem como permitir o aumento do número de esporos para estudos de microscopia eletrônica e biologia molecular. Modelos animais são necessários para estudos de rota de transmissão, resposta imunológica, estratégias terapêuticas e produção de anticorpos mono e policlonais. Diferentes animais de laboratório (camundongos, coelhos, macaco rhesus), com características específicas, são empregados.
- **Sorologia:** uma variedade de métodos sorológicos (teste da imunofluorescência indireta, ensaio de imunoabsorção enzimática, contraimunoeletroforese, *Western blotting*) têm sido estabelecidos para detectar imunoglobulina G e M contra certos microsporídios. Essas provas sorológicas parecem ser adequadas aos estudos epidemiológicos. No entanto, não está claro se esses testes representam, de fato, uma infecção verdadeira, uma reação cruzada com outros organismos ou uma reação inespecífica.
- **Biologia molecular:** provas moleculares têm sido empregadas para a detecção e identificação de espécies patogênicas. Esses métodos são ainda importantes para a classificação taxonômica e estudos filogenéticos. A técnica da PCR tem sido utilizada para o diagnóstico laboratorial e diferenciação de espécies de microsporídios agentes de doença humana. Diversos *primers* têm sido descritos para amplificar sequências de genes de diferentes espécies de microsporídios. A subunidade menor do rRNA e a região ITS têm sido utilizadas como alvos moleculares principais. De maneira geral, a PCR é significativamente mais sensível e específica do que a microscopia, mas ainda não está disponível em muitos laboratórios de rotina. Outra técnica molecular que tem sido também estabelecida para o diagnóstico de infecção em humanos é a hibridização *in situ*. Sondas específicas são direcionadas contra a subunidade menor do rRNA do microsporídio infectante, detectando sua sequência no tecido, o que permite a identificação de diferentes estágios fúngicos (plasmodial e esporo) no citoplasma da célula do hospedeiro. Essa técnica, todavia, é laboriosa e sua sensibilidade e especificidade ainda precisam ser determinadas.

Diagnóstico diferencial

As microsporidioses devem ser diferenciadas de infecções causadas por citomegalovírus, *Mycobacterium* sp., *Cryptosporidium* sp., *Ciclosporidium* sp., *Isospora* sp., *Leishmania* sp., *Toxolpasma* sp. e *Criptococcus* sp.

Prognóstico e tratamento

A maioria das infecções extraintestinais ocorre como parte de doença disseminada e tem um prognóstico mais reservado do que aquelas infecções gastrointestinais, por estarem relacionadas a imunocomprometimentos de base e a um diagnóstico difícil, o que leva, consequentemente, a demoras na instituição do tratamento específico. Nesse sentido, a reconstituição imunológica, sendo possível, é essencial para a resolução da infecção. O albendazole, no entanto, é a droga de escolha para a maioria das espécies que infectam os seres humanos. Outras drogas têm sido utilizadas também no controle

e tratamento das infecções por esses organismos tais como fumagilina, análogos das poliaminas, nicomicinas, fluoroquinolonas, atovaquona, azitromicina, furazolidona, itraconazol, metronidazol, nitazoxanida, octreotida, sinefungina e sulfas. Como a transmissão hídrica é frequente, para o controle e a prevenção da microsporidiose, tratamentos com ozônio, cloração, exposição ao ultravioleta e irradiação gama têm sido efetivos na redução da viabilidade e infectividade desses organismos na água de abastecimento, para consumo e irrigação.

PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Etiologia e epidemiologia

A paracoccidioidomicose é uma micose granulomatosa e supurativa, progressiva e de evolução subaguda ou crônica. A doença compromete, primariamente, os pulmões, com disseminações a outros órgãos e sistemas. O envolvimento de pele, membranas mucosas, linfonodos e suprarrenal é comum. Ocasionalmente, o trato gastrointestinal e outras vísceras extrapulmonares podem ser acometidos. Formas subclínicas têm sido observadas em indivíduos aparentemente imunocompetentes, residentes em áreas endêmicas. O *Paracoccidoides brasiliensis* e o *Paracoccidioides lutzii* são os agentes etiológicos desse processo micótico. Atualmente, tem sido proposta a existência de um complexo fúngico, denominado complexo *Paracoccidioides brasiliensis*, ao qual essas duas espécies pertencem. O fungo é dimórfico, exibindo um crescimento micelial, na natureza, e leveduriforme, nos tecidos. A morfologia da fase filamentosa é caracterizada pela presença de hifas septadas hialinas, com esparsos clamidósporos e raros conídios, enquanto a fase leveduriforme apresenta células de levedura grandes (4 a 30 μm) e globosas, paredes duplas e refringentes, e múltiplas gemulações. Solos ácidos e com grande quantidade de substâncias orgânicas, em regiões úmidas e florestas com muitos cursos de água, têm sido relacionados ao *habitat* do *P. brasiliensis*. A doença é endêmica, na América Latina, nas áreas de clima subtropical com elevado índice pluviométrico (900 a 18.000 mm/ano) e temperaturas médias de 17 °C a 24 °C. Com relação à distribuição geográfica, a paracoccidioidomicose se estende do México até o norte da Argentina e Uruguai. O Brasil contabiliza 80% dos casos relatados. Em contrapartida, Caribe, Nicarágua, Suriname, Guianas e Chile parecem estar fora da área de endemicidade. Essa micose é menos descrita em crianças e jovens, mas é regularmente diagnosticada em indivíduos adultos com idade entre 30 a 60 anos. Tipicamente, a doença acomete com maior frequência pessoas do sexo masculino (13 homens:1 mulher), cuja ocupação principal é rural. Interessante notar que, apesar da doença quase não acometer os animais de áreas endêmicas, o tatu (*Dasypus novemcinctus*) pode desenvolver a paracoccidioidomicose, sendo esse fato considerado uma etapa importante no ciclo vital do fungo.

Clínica e patologia

A via de infecção mais comum é a respiratória. Contudo, traumatismos com material vulnerante de natureza vegetal podem implantar o *P. brasiliensis* na pele e membranas mucosas. Após a inalação dos elementos fúngicos infectantes, essas estruturas podem ser destruídas ou se implantar no parênquima, dando origem a um foco primário pulmonar. Essa infecção pode se manter assintomática ou desencadear uma série de manifestações clínicas. A doença pode surgir sem apresentar um período de latência detectável ou, o que é mais frequente, ser consequência da reativação de focos quiescentes. Uma forma juvenil aguda ou subaguda e uma forma crônica, típica do indivíduo adulto, são distinguidas na paracoccidioidomicose. Na forma juvenil, os pacientes são crianças ou jovens e apresentam alterações na resposta de base celular. Evolução rápida e progressiva, disseminação hematogênica e importante comprometimento de baço, fígado, linfonodo e medula óssea caracterizam essa forma de paracoccidioidomicose. Clinicamente, são observados mal-estar geral, febre séptica, astenia, anorexia, perda de peso e anemia, bem como hepatoesplenomegalia, linfadenites e disfunções medulares. O enfartamento de lifonodos mesentéricos pode levar à compressão intestinal e à síndrome do abdômen agudo. Os gânglios tendem a sofrer necrose caseosa ou supuração, abrindo-se em fístulas ou úlceras cutâneas. Pequenas pápulas com vértice ulcerado e cobertas por crostas, abscessos subcutâneos, úlceras do trato gastrintestinal e osteomielite são frequentes. A paracoccidioidomicose, em sua forma adulta, acomete mais de 90% dos pacientes, evoluindo de maneira lenta durante meses ou anos. Diferentemente da forma juvenil, as manifestações pulmonares são a principal clínica desse tipo de paracoccidioidomicose. A sintomatologia observada é característica de infecção crônica do aparelho respiratório, com tosse, expectoração, hemoptise, dispneia, dor torácica e febre baixa. Caquexia e insuficiência respiratória podem levar a óbito. De maneira geral, essas manifestações clínicas são resultado da reativação de lesões quiescentes que ficaram como sequelas de uma infecção primária dos pulmões. Em consequência de disseminações, o envolvimento focal pulmonar pode determinar lesões multifocais extrapulmonares. Mucosas oral e nasal, laringe, pele, linfonodos e glândula suprarrenal podem ser acometidos. Os processos orofaringeanos cursam com odontalgias, parestesias peridentárias, halitose e sialorreia. Disfonia, disfagia e dispneia obstrutiva podem ocorrer em virtude do comprometimento da laringe. O acometimento de suprarrenal pode levar a sintomas da síndrome de Addison. Microabscessos, pápulas, úlceras muriformes, granulomas hipertróficos e amigdalite oculta são as principais lesões de mucosa. A pele pode exibir lesões nodulares, papulares, pustulares, ulceradas, necróticas e hemorrágicas. Os gânglios linfáticos subcutâneos podem se apresentar hipertrofiados e necróticos, com fístulas que drenam um exsudato supurativo. Menos frequentemente, lesões oculares, meningoencefálicas, ósseas e vasculares são descritas. A maioria dos casos de paracoccidioidomicose crônica apresenta lesões cutaneomucosas, ganglionares, pulmonares e suprarrenais. Uma forma residual pode ocorrer, após a cura clínica da doença, pela presença de fibroses que surgem como sequelas. As fibroses podem determinar estenose de laringe ou traqueia, atresia bucal e fibroenfisema pulmonar. Dispneia e restrição cardiopulmonar são observadas em 60% a 80% desses pacientes.

Diagnóstico laboratorial

Tradicionalmente, o diagnóstico definitivo de paracoccidioidomicose é feito através de métodos micológicos convencionais como microscopia de *espécimens* clínicos, cultura para isolamento e identificação do *P. brasiliensis* e testes sorológicos que são empregados como apoio ao diagnóstico.

- **Exame direto e histopatologia:** um diagnóstico presuntivo de paracoccidioidomicose pode ser obtido quando células leveduriformes esféricas ou ovaladas grandes (4 a 30 μm ou 60 μm), de paredes espessas (0,2 a 1 μm), refringentes e com múltiplas gêmulas (2 a 10 μm) são observadas na amostra clínica tratada com KOH a 10% ou calcoflúor branco. Caracteristicamente, esses brotamentos apresentam uma estreita região de inserção entre a gêmula e a célula mãe. De forma ocasional, o *P. brasiliensis* aparece como células simples ou em pequenas cadeias, unibrotantes e com morfologia alongada, o que dificulta a diferenciação com outros patógenos fúngicos. A resposta granulomatosa e supurativa com infiltrado polimorfonuclear, mononuclear, macrófagos e células gigantes, bem como os elementos leveduriformes multigemulantes intra e extracelulares podem ser visualizados em coloração histopatológica com hematoxilina e eosina (HE) e Papanicolaou. Técnicas teciduais mais específicas para fungos como Gomori-Grocott (prata) e ácido periódico de Schiff (PAS) podem ser empregadas.
- **Cultura:** A amostra clínica deve ser inoculada em meios mais enriquecidos como ágar BHIA ou ágar sangue com ou sem cloranfenicol e cicloheximida, dependendo de onde o material clínico foi coletado, se de um sítio estéril ou contaminado. A incubação deve ser procedida à temperatura de 30 °C para isolamento da fase micelial do *P. brasiliensis*. Meios com antimicrobianos não devem ser incubados à temperatura de 37 °C, tendo em vista o fungo ser sensível aos antibióticos e antifúngicos adicionados nos meios de isolamento primário, quando temperaturas elevadas são empregadas. O tempo de incubação deve se estender por até 4 semanas, pois os cultivos desse agente não são fáceis de serem obtidos e o crescimento da fase filamentosa é lento. Como a morfologia filamentosa do *P. brasiliensis* não revela aspectos característicos ou específicos, a conversão à fase leveduriforme é recomendada. Para tanto, subcultivos do isolado primário devem ser feitos em ágar Sabouraud dextrosado (SDA) ou ágar infusão de cérebro-coração (BHIA), sem antimicrobianos, à temperatura de 37 °C.

  Paracoccidioides brasiliensis (Splendore) Almeida, 1930.
  - **Fase filamentosa:**
    - **Morfologia macroscópica:** cresce muito lentamente a 30 °C, necessitando de 3 semanas ou mais para se desenvolver. Inicialmente, as colônias são compactas (atingem 1 a 2 cm em 10 dias), planas a rugosas, com dobras, glabrosas e consistentes, desenvolvendo, posteriormente, tufos de pequeno micélio aéreo que, eventualmente, cobre a sua superfície, dando um aspecto velutino a flocoso. A cor varia de branco a bege com o reverso marrom-acastanhado.
    - **Morfologia microscópica:** as hifas são septadas, hialinas, delgadas e medem 0,8-2,5 μm. Muitas hifas mostram dilatações na região septal (hifas em raquete). Clamidósporos (6,5-30 μm) intercalares ou terminais são produzidas por todas as culturas. Os isolados não esporulam bem nos meios micológicos de uso corrente, todavia, se conídios são produzidos, esses são unicelulares, piriformes a ovais (3 a 4 μm) e formados sobre pequenos conidióforos (2 a 3 μm) ou diretamente sobre as hifas vegetativas. Artrósporos triangulares ou retangulares com paredes espessas, formados de maneira alternativa na hifa submersa ou aérea, podem ser observados. Em alguns isolados, artrósporos intercalares podem expandir-se para um dos lados, formando um esporo de parede fina e séssil. A esporulação pode ser induzida no isolamento primário pela inoculação em extrato de levedura ou ágar água e incubados a 22 °C-26 °C. Meios com altas concentrações de glicose não são adequados para uma boa esporulação. Relativamente às características micromorfológicas de *P. lutzii*, essas apresentam pequenas diferenças quando comparadas com as do *P. brasiliensis*, todavia, é possível observar que os conídios de *P. lutzii* são mais alongados do que os conídios de *P. brasiliensis,* que se mostram mais curtos e arredondados.
  - **Fase leveduriforme:**
    - **Morfologia macroscópica:** as colônias têm um aspecto "aglomerado" ou "amontoado", são brancas, beges a amarronzadas, úmidas, pastosas, macias, tornando-se cerosas e leveduriformes. **Morfologia microscópica:** as células de levedura têm 2 a 3 μm de diâmetro ou mais, a parede celular é dupla e refringente, são ovais ou de forma irregular e apresentam uma ou múltiplas gemulações unidas à célula mãe por uma base de inserção estreita. Pequenas cadeias de células ou figuras características, denominadas "chapéu de Mickey" e "roda de leme", são frequentemente produzidas. As células de *P. brasiliensis* são mais delgadas do que as de *Blastomyces dermatitidis*.
- **Métodos não culturais:** a maioria dos casos de paracoccidioidomicose ativa apresenta anticorpos detectáveis pelas provas sorológicas habitualmente empregadas. O antígeno imunodominante do *P. Brasiliensis* é uma glicoproteína de peso molecular de cerda de 43kDa, denominada gp43. Imunodifusão dupla de Ouchterlony, fixação de complemento, contraimunoeletroforese e ensaio imunoenzimático, bem como precipitação em tubo, aglutinação em látex e imunofluorescência indireta são alguns dos sistemas empregados para o sorodiagnóstico da paracoccidioidomicose. Testes cutâneos com paracoccidioidina podem demonstrar reações de hipersensibilidade retardada, permitindo avaliar o estado imunológico do paciente e a prevalência da exposição ao fungo, em estudos epidemiológicos. A radiografia de tórax também

tem sido empregada como prova auxiliar no diagnóstico da paracoccidioidomicose. Apesar dos achados radiográficos serem extremamente variados, alguns padrões estão sempre presentes. Infiltrados intersticiais e alveolares, consolidação lobular, nódulos, fibrose, adenopatias, enfisemas, cavitação e paracoccidioidoma são comumente descritos.

Diagnóstico diferencial

As patologias a serem consideradas na diferenciação da paracoccidioidomicose, tendo em vista a semelhança de padrões anatomoclínicos e/ou a coincidência de áreas de endemicidade, são a leishmaniose mucocutânea, doença de Chagas, esquistossomose, carcinoma de células escamosas, leucemias, linfomas, histoplasmose, tuberculose, sífilis secundária e terciária, e sarcoidose.

Prognóstico e tratamento

A forma juvenil da paracoccidioidomicose e o comprometimento adrenal e meningoencefálico é sempre de prognóstico ruim. As drogas de escolha são cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, anfotericina B em sua apresentação tradicional, lipossomal ou lipídica, e sulfonamidas (sulfadiazina, sulfametoxipiridazina) e suas combinações (sulfametoxazol-trimetoprima, sulfadiazina-trimetoprima).

PIEDRAS E TRICOSPORONOSE

Etiologia e epidemiologia

As piedras são doenças fúngicas associadas ao fio de cabelo (tricomicoses). O aspecto clínico mais evidente é a produção de nódulos que se encontram aderidos à cutícula do pelo e são formados por material fúngico unido por substância cimentante. Duas formas clínicas são conhecidas: piedra negra e piedra branca. Apesar de apresentarem um comportamento clínico semelhante, seus agentes etiológicos são distintos. A piedra negra é causada pelo fungo *Piedraia hortae,* que é um Ascomycota. Esse fungo forma nódulos consistentes de coloração negra na extremidade livre de pelos de seres humanos e animais. O couro cabeludo é o sítio anatômico mais afetado. A formação desses nódulos é claramente limitada aos fios de cabelo, não sendo observada infecção em outros órgãos. A doença ocorre, principalmente, em regiões de clima tropical úmido da América Latina, África, Índia e Ásia e Oceania. As florestas nativas dessas áreas parecem ser o reservatório desse fungo, que têm no solo sua principal fonte de infecção. No entanto, há relatos de doença em nadadores e em indivíduos que se banham em rios ou águas estagnadas, sugerindo o *habitat* aquático como outra fonte do fungo. O sexo masculino parece apresentar uma ligeira preponderância sobre o feminino. Uma outra espécie, *Piedraia quintanilha,* tem sido isolada apenas de pelos de primatas não humanos na África. A piedra branca, por sua vez, é causada por espécies do gênero *Trichosporon*, um fungo pertencente ao Filo Basidiomycota, Família Cryptococcaceae. Dentre as várias espécies, *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon inkin* e *Trichosporon ovoides* são as mais frequentemente associadas com essa condição. *Trichosporon* sp. produz nódulos macios de aspecto esbranquiçado em fios de cabelos do couro cabeludo e das axilas e pelos pubianos. Animais como cavalos e macacos também podem ser acometidos. A doença é encontrada, principalmente, em regiões tropicais e temperadas das Américas, Europa e Ásia. O fungo tem como *habitat* o solo, águas paradas, vegetais e alimentos deteriorados. Além disso, é membro da microbiota da pele, região genital, trato gastrointestinal e respiratório. A piedra branca acomete tanto homens quanto mulheres, contudo, a piedra genital é mais comum em homens.

Clínica e patologia

A infecção em piedra negra é tipicamente assintomática, não havendo manifestações clínicas ou qualquer reação física por parte dos pacientes. Na verdade, o processo está relacionado apenas a alterações estéticas. Essa infecção inicia-se abaixo da cutícula do pelo e, progressivamente, aumenta de tamanho, se desenvolvendo por cima e por fora do fio de cabelo, envolvendo-o e formando uma massa fusiforme firmemente aderida. Nesse processo, pela pressão do crescimento subcuticular, pode haver a ruptura do pelo, contudo, o fungo não penetra no córtex e o folículo piloso não é envolvido. Os nódulos formados têm grande variação em seu diâmetro e comprimento (0,5-4 mm). Ao toque, o pelo exibe um aspecto rugoso, arenoso ou granular. No nódulo maduro, pode-se observar que o centro é mais espesso do que a periferia. Na área periférica, é possível visualizar uma única camada de células, onde os feixes de hifas estão mais alinhados. A parte central, entretanto, é constituída por muitas camadas celulares e os elementos fúngicos estão unidos por substância cimentante, formando uma massa pseudoparenquimatosa, que se assemelha a um tecido organizado. No interior desse estroma, principalmente em sua parte periférica, há lojas ou lóculos onde são produzidos ascos que apresentam apêndices em suas extremidades (ascos bitunicados). Entre a cutícula e o córtex, tanto na parte cujas camadas são simples quanto naquela que apresenta múltiplas camadas, artrósporos podem ser encontrados. Nos nódulos da piedra negra, pode haver colonização por *Trichosporon* sp.

Ao contrário dos nódulos da piedra negra, os nódulos produzidos na piedra branca são macios, mucilaginosos, de coloração branca ou esverdeada e pouco aderentes, medindo (1 a 4 mm). Frequentemente, os pelos acometidos são os da região axilar, genital, barba e bigode, sobrancelhas e, mais eventualmente, couro cabeludo. A infecção também se inicia abaixo da cutícula, após alguma lesão. Progressivamente, o fungo aprofunda a infecção, tomando todo o pelo. Os nódulos formados variam de tamanho e forma, mas, geralmente, são menores do que os da piedra negra. Vários nódulos, todavia, podem ser formados no fio de cabelo. Com o desenvolvimento da infecção, esses nódulos podem coalescer, dando origem a uma extensa massa em torno do pelo. Em decorrência do enfraquecimento do fio de cabelo no local de formação do nódulo, esse pode romper-se, deixando uma

extremidade intumescida. A cutícula, a medula e o folículo também não são acometidos na piedra branca. Os nódulos são formados por hifas hialinas entrelaçadas que se fragmentam, produzindo artrósporos e blastósporos. Como na piedra negra, não há reação inflamatória e nem manifestações clínicas notáveis nos indivíduos acometidos.

Diagnóstico laboratorial

- **Exame direto e histopatologia:** a partir do exame microscópico direto com KOH a 10% a 20% dos nódulos, é possível diferenciar as duas piedras. Na piedra negra, os nódulos apresentam um estroma compacto, formado por hifas dicotomicamente ramificadas e segmentadas e células romboides (artrósporos) de paredes grossas, dispostas de forma alinhada, mantidas unidas por uma substância cimentante. Essas hifas e células medem cerca de 4 a 8 μm de diâmetro e apresentam parede celular pigmentada. No estroma dos nódulos, existem ainda lóculos com grande número de ascos contendo de 2 a 8 ascósporos (30 a 10 μm) fusiformes, encurvados e com um simples filamento polar (10 μm). Na piedra branca, é possível observar a presença de hifas hialinas, ramificadas e segmentadas, dispostas perpendicularmente, artrósporos (2 a 4/8 μm) retangulares ou poligonais, e blastósporos ovais gemulantes. Não há formação de estruturas sexuadas. É possível ocorrer contaminação bacteriana na massa fúngica.
- **Cultura:** O pelo infectado é depositado sobre o ágar Sabouraud dextrosado com cloranfenicol e sem cicloheximida. Os agentes de ambas as piedras crescem bem nos meios micológicos de rotina, contudo, é importante considerar que *Trichosporon* spp. são sensíveis à cicloheximida, não sendo o mycosel um meio adequado. A *P. hortae* cresce de forma muito lenta a 25 °C -30 °C e desenvolve colônias pequenas, escuras e aderentes. A micromorfologia é representada por hifas demáceas de paredes espessas, septadas e ramificadas, artrósporos e clamidósporos, também demáceos, ascoestroma, lóculos, ascos e ascósporos. O gênero *Trichosporon,* todavia, tem um rápido crescimento tanto à temperatura ambiente quanto a 37 °C. As colônias produzidas têm um aspecto leveduriforme, com estrias e pregas e coloração esbranquiçada. A morfologia microscópica é constituída por hifas septadas, hialinas e ramificadas, e artrósporos retangulares e arredondados de coloração clara. Os Quadros 63.4 e 63.5 apresentam as principais características morfológicas e bioquímicas das espécies de *Trichosporon*.

Piedra hortae (Brumpt) Fonseca e Arêa Leão, 1928.

- **Morfologia macroscópica:** a taxa de crescimento do fungo é lenta, atingindo a maturidade em 21 dias. A colônia se mostra circunscrita, de coloração negra ou esverdeada, cônica e aderida ao meio. No centro da colônia, pode ser observado um aspecto cerebriforme elevado e, na borda, uma morfologia mais plana. As colônias jovens, todavia, são lisas, produzem um micélio aéreo curto e de coloração olivácea e um pigmento avermelhado no meio.
- **Morfologia microscópica:** *Piedraia hortae* apresenta hifas de paredes espessas, septadas, ramificadas, em feixes estreitos, clamidóporos e células intumescidas. O micélio frequentemente fragmenta-se para produzir artrósporos retangulares (4 a 8 μm). Na parte central, mais superficialmente, são encontradas lojas ou lóculos (30 a 60 μm) globosas ou ovais, sem paredes, distribuídas irregularmente, com numerosos ascos (30 a 60 μm) que contêm em seu interior de 2 a 8 ascósporos (30 a 10 μm) unicelulares, de paredes evanescentes, fusiformes, encurvados e bitunicados, com um único filamento polar (10 μm) em cada extremidade. Essas lojas se abrem para a superfície através de um poro ostiolar.

Trichosporon (Behrend, 1890).

- **Morfologia macroscópica:** as colônias são de coloração creme, textura úmida ou seca, e podem apresentar ou não uma cobertura farinhosa.
- **Morfologia microscópica:** hifas septadas, hialinas e ramificadas estão presentes e não há formação de pseudomicélio. Artrósporos são usualmente abundantes, no entanto, blastósporos globosos, claviformes e laterais podem ser também produzidos. Apressórios, sarcinas (células arredondadas ou elipsoides que se desenvolvem isodiametricamente e que se subdividem em algumas células separadas), células gigantes fusiformes e endoconídios são, ocasionalmente, observados. Em sua maioria, os septos hifálicos são do tipo doliporo, podendo estar ou não associados a parentossomos vesiculares ou tubulares. Não há fase sexuada conhecida. A fermentação é ausente. A reação com o Diazônio Azul B (DBB) é positiva, a ureia é hidrolisada, coenzimas Q-9 e Q10 são formadas (a principal, ubiquinona, é CoQ-9 ou CoQ10) e xilose está presente nos hidrolisados celulares.

Trichosporon ovoides (Behrend, 1890; Vulleim, 1902). Encontrado como membro da microbiota da pele e acomete os fios de cabelo.

- **Morfologia macroscópica:** cresce à temperatura ambiente em meios de rotina como o ágar Sabouraud dextrosado com cloranfenicol, mas sem cicloheximida, por ser inibido por esse antifúngico. As colônias se desenvolvem nos meios de cultura entre 5-8 dias e são circunscritas, leveduriformes, cremosas, acuminadas, cerebriformes, de coloração branca a amarelada e sem produção de pigmentos.
- **Morfologia microscópica:** as hifas (4 a 8 μm) são septadas, hialinas e ramificadas. Artrósporos ovais ou retangulares (2-3 × 4-8 μm) e blastósporos (2 a 4 μm) gemulantes, agrupados ou em cadeia estão presentes.
- **Provas bioquímicas:** assimila, mas não fermenta, glicose, maltose e sacarose. Não utiliza nitrato de potássio.

Quadro 63.4 Súmula da morfologia das espécies de *Trichosporon* de interesse médico.

Espécies	Características fúngicas	
	Colônia	**Micromorfologia**
T. asahii	Colônias em SDA, atingindo 16-24 mm de diâmetro em 10 dias, são grandes, secas, grumosas, pustulares, com uma cobertura farinhosa, branca e uma ampla zona marginal com fissuras profundas	Blastósporos sem conídios laterais, artrósporos regulares, cilíndricos ou em forma de barril, não há ramificações. Apressórios não são produzidos
T. asteroides	Colônias em SDA, atingindo 10 mm de diâmetro em 10 dias, são cerebriformes, secas, cremes, com zona externa radialmente sulcada, tendo uma aparência fosca ou opaca	Blastósporos sem conídios laterais, artrósporos alongados, que não se desarticulam com facilidade, hifas com protuberâncias que se dividem e formam pequenas células que podem apresentar septações
T. cutaneum	Colônias em SDA, atingindo 15-17 mm de diâmetro em 10 dias, são moderadamente grandes, cerebriformes, brilhantes, sem aparência farinhosa com o passar do tempo, desenvolvem ampla zona marginal com fissuras	Isolados em cultivos primários ou recentes podem ser constituídos por numerosas células de levedura com blastósporos, que, na maioria das vezes, tornam-se hifas com sucessivos subcultivos. Os elementos hifálicos são frequentemente ramificados para trás. Artrósporos são cilíndricos e esferoidais
T. inkin	Colônias em SDA, atingindo 9-12 mm de diâmetro em 10 dias, são limitadas, finamente cerebriformes, grumosas, brancas, brilhantes farinhosas e sem zona marginal com fissuras	Blastósporos sem conídios laterais, artrósporos grandes e cilíndricos, ramificações irregulares eventuais, sarcinas ou intumescência hifálicas. Apressórios podem estar presentes em MEA e, na maioria das vezes, se desenvolvem logo abaixo do septo
T. mucoides	Colônias em SDA, atingindo 13-17 mm de diâmetro em 10 dias, são relativamente grandes, úmidas e brilhantes, elevadas, com fissuras radiais estreitas e profundas	Blastósporos em cultivos primários, cadeias de artrósporos cilíndricos ou irregulares são formadas, tendo ramificações laterais curtas, terminando em conídios claviformes de paredes espessas
T. ovoides	Colônias em SDA, atingindo 10-13 mm de diâmetro em 10 dias, são limitadas, secas, brancas, farinhosas, grumosas, irregularmente dobradas no centro e com uma zona marginal lisa/plana	Blastósporos sem conídios laterais, artrósporos cilíndricos, ramificações irregulares. Apressórios são regularmente formados em MEA

Legenda: SDA: Ágar Sabouraud Dextrosado; MEA: Ágar Extrato de Malte.

Quadro 63.5 Resumos das características bioquímicas das espécies de *Trichosporon* de interesse médico.

Provas bioquímicas	*T. asahii*	*T. asteroides*	*T. cutaneum*	*T. inkin*	*T. mucoides*	*T. ovoides*
L-arabinose	+	+	+	–	+	v
Sorbitol	–	–	+	–	+	-
Melibiose	–	–	+	–	+	-
Mio-Inositol	–	+	+	+	+	-
Crescimento 37°C	+	v	–	+	+	v
Cicloheximida 0,1%	+	v	–	v	–	+
Apressórios	–	–	–	+	–	+

Trichosporon inkin (Oho ex M. Ota) (Carmo-Souza e van Uden, 1967). Encontrado como membro da microbiota da pele e acomete os fios de cabelo da região inguinocrural.

- **Morfologia macroscópica:** cresce à temperatura ambiente em meios de rotina como o ágar Sabouraud dextrosado com cloranfenicol, mas sem cicloheximida, por ser inibido por esse antifúngico. As colônias se desenvolvem de forma rápida nos meios de cultura entre 3-5 dias e são limitadas, leveduriformes, cremosas, acuminadas, cerebriformes, fissuradas e de coloração branca a amarelada.
- **Morfologia microscópica:** as hifas (4 a 8 μm) são septadas, hialinas e ramificadas, e irregulares. Pode-se observar artrósporos retangulares (2-3 × 4-8 μm), blastósporos (2 a 4 μm) gemulantes, agrupados ou em cadeia, e apressórios, que são estruturas cúbicas tridimensionais decorrentes de ramificações irregulares, e conídios dispostos em sarcinas.
- **Provas bioquímicas:** assimila inositol como única fonte de carbono e não assimila arabinose, sorbitol, ramnose, rafinose e melibiose. Não fermenta carboidratos. Hidrolisa a ureia. Cresce a 37 °C e a 40 °C de forma variável.

Trichosporon cutaneum (de Beurmann, Gougerot e Vaucher) Ota, 1926. Esse fungo tem sido isolado de pele e mucosa de indivíduos saudáveis. Cresce à temperatura ambiente, em meios como o ágar Sabouraud dextrosado com cloranfenicol e sem cicloheximida. As colônias se desenvolvem de forma rápida nos meios de cultura, entre 3-5 dias, e são limitadas, úmidas, sulcadas, cerebriformes, bolhosas e de coloração branco-amarelado.

- **Morfologia microscópica:** as hifas (4 a 8 μm) são septadas, hialinas e ramificadas, e irregulares. Artrósporos retangulares (3-4 × 4-8 μm), blastósporos (2 a 4 μm) gemulantes, laterais e abundantes.
- **Provas bioquímicas:** assimila arabinose, sorbitol, melibiose e mio-inositol, mas não fermenta carboidratos. Hidrolisa a ureia. Cresce bem a 37 °C e pode formar películas ou biofilmes.

Diagnóstico diferencial

Os processos clínicos que devem ser considerados na diferenciação com as piedras são as dermatofitoses, lêndeas e piolhos, moniletrix tricoptilose, pediculose, tricomicose axilar e tricorex nodosa.

Prognóstico e tratamento

As piedras apresentam um bom prognóstico, tendo em vista não colocarem em risco a vida dos indivíduos acometidos. O tratamento é procedido pela tonsura dos pelos das áreas afetadas e pelo uso de antifúngicos de aplicação tópica ou oral para prevenir a recorrência como azoles (bifonazol, cetoconazol, econazol, fluconazol, itraconazol, isoconazol e miconazol), ciclopiroxolamina e terbinafina.

Tricosporonose (infecção por *Trichosporon* spp.)

A tricosporonose é um termo que inclui infecções mucocutâneas e sistêmicas causadas por fungos do gênero *Trichosporon*. Diversas espécies têm sido reconhecidas como agentes dessa condição, sendo que as mais comuns são *Trichosporon asahii, Trichosporon asteroides, Trichosporon cutaneum* (anteriormente *Trichosporon beigelii*), *Trichosporon inkin, Trichosporon mucoides e Trichosporon ovoides*. Outras espécies descritas incluem *Trichosporon dermatis*, *Trichosporon dohaense, Trichosporon domesticum, Trichosporon coremiiforme*, *Trichosporon faecale, Trichosporon loubieri, Trichosporon japonicum, Trichosporon jirovecii, Trichosporon montevideese e Trichosporon mycotoxinivorans*. Em termos morfológicos, *Trichosporon* sp. apresenta hifas septadas hialinas e ramificadas e se reproduz, assexuadamente, por artroesporulação. Nesse processo, segmentos da hifa vegetativa sofrem fragmentação e desarticulação, formando artrósporos que podem germinar, produzindo nova hifa, ou gemular, produzindo blastósporos. Os agentes da tricosporonose apresentam uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrados em vários *habitats*, no entanto, são mais prevalentes em regiões de clima tropical e temperado, particularmente, nas Américas. As espécies de *Trichosporon* têm sido isoladas de solo, água, ar, madeira, material em decomposição e guanos de aves e animais. Ao mesmo tempo, algumas espécies como *T. asahii, T. cutaneum* e *T. inkin* têm sido encontradas como membros da microbiota do trato gastrointestinal e genital e vias respiratórias dos hospedeiros humanos. As manifestações clínicas dessa enfermidade são variadas e incluem queratomicose, otomicose e onicomicose, e dermatomicoses com aspectos clínicos semelhantes às candidíases, bem como infecções invasivas nosocomiais, cuja taxa de mortalidade é elevada (40% a 80%). Como doença oportunista, os fatores predisponentes associados mais frequentes são neoplasias hematológicas, diabetes, HIV, cateteres, cirurgias, transplantes e procedimentos invasivos, UTI, citostáticos e corticoterapia. A tricosporonose invasiva cursa com quadros de pneumonia com infiltrados difusos ou reticulonodulares e de septicemia, e formas disseminadas que afetam múltiplos órgãos tais como pele (lesões maculopapulares), cérebro (encefalite), coração (endocardite e v***ál***vulas nativas e protética), baço e fígado (abscessos). Os principais agentes dessas formas invasivas e disseminadas são *T. asahii* e *T. mucoides*. Uma forma disseminada crônica pode ocorrer em indivíduos que se recuperam de uma neutropenia, exibindo febre, hepatoesplenomegalia e abscessos múltiplos. Outra forma observada é a tricosporonose de hiato, em pacientes com tumores hematológicos, que surge nos indivíduos sob quimioterapia antifúngica com candinas, para outras infecções fúngicas. A tricosporonose disseminada do neonato pode ocorrer em crianças de muito baixo peso ao nascer que entram em contato com esses fungos, durante a passagem pelo canal do parto, ou através das mãos do pessoal de saúde. O diagnóstico laboratorial é iniciado pelo exame microscópico direto dos *espécimens* clínicos com KOH 10% ou 40%, permitindo a visualização de micélio hialino septado, artrósporos e blastóporos aderidos às hifas ou livres nos tecidos. A histo-

patologia pode ser realizada com o emprego da coloração de Gromori-Grocott (prata) e ácido periódico de Schiff (PAS). Esses fungos podem ser inoculados em meios de cultura de rotina como o ***á***gar Sabouraud dextrosado com cloranfenicol e sem cicloheximida e incubados ***à*** temperatura de 25 °C. Uma colônia leveduriforme, cremosa, esbranquiçada a acinzentada, cerebriforme, membranosa ou seca, surge em torno de 4-6 dias de incubação. Para a identificação das espécies, devem ser empregadas provas bioquímicas de assimilação de carboidratos manuais ou automatizadas. *Trichosporon* spp são tipicamente urease-positivos, o que permite sua separação de *Geotrichum* sp. e *Magnusiomyces* sp. A tricosporonose deverá ser diferenciada de candidíases, geotricose, dermatofitoses e micoses invasivas. Dependendo da doença de base do hospedeiro, o prognóstico da tricosporonose invasiva pode ser de reservado a ruim. Esse fungo é sensível ao cetoconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e às formulações lipídicas de anfotericina B. Os derivados da equinocandinas/pneumocandinas t***ê***m pouca ação sobre *Trichosporon* sp. O fluconazol também é pouco efetivo e algumas espécies podem ser resistentes à anfotericina B (*T. asahii, T. coremiiforme* e *T. faecale*).

PITIOSE

Etiologia e epidemiologia

A pitiose é uma pseudomicose, que acomete animais e seres humanos, causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum*, cuja característica principal é a ocorrência de lesões granulomatosas cutâneas e subcutâneas, que tendem a propagar-se, por contiguidade, por via linfática ou hematogênica. Uma caraterística notável desse patógeno é a intensa angioinvasão, que leva a alterações vasculares importantes. Embora anteriormente considerado um fungo aquático, taxonomicamente, *Pythium insidiosum* pertence ao Reino Stramenopila, Filo Oomycota, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales e Família Pythiaceae. Esse organismo se diferencia dos fungos por não apresentar quitina em sua parede celular e nem ergosterol na membrana citoplasmática. Além disso, utiliza rotas biossintéticas diferentes e apresenta esporos biflagelados móveis como propágulos. De acordo com estudos moleculares, esses organismos têm a mesma linha Filogenética de protistas ligados a algas e plantas. Em sua parede celular, inclusive, o principal componente é a celulose. Os Oomycetes são normalmente fitopatógenos que se desenvolvem em meio aquático como pântanos e águas estagnadas, colonizando os vegetais. Em seu ciclo de vida, produzem esporângios, chamados de zoosporângios, que liberam, ao amadurecerem, ao mesmo tempo, um grande número de esporos endógenos assexuados, denominados zoósporos. Os zoósporos livres nadam até atingirem um novo vegetal, onde se fixam e encistam, perdendo os flagelos e dando origem a hifas hialinas asseptadas que irão formar novos zoosporângios, reiniciando o ciclo reprodutivo. *Pythium insidiosum* tem uma distribuição mundial, sendo descrito em climas temperados, tropicais e subtropicais com grande umidade como Tailândia, Índia, Coreia, Japão, Malásia, Nova Zelândia, Austrália, Estados Unidos, México, Costa Rica, Haiti, Brasil, Argentina, Colômbia, Venezuela, África e Europa. A pitiose acomete indivíduos adultos, sendo esporádica em crianças. Em medicina veterinária, acomete, principalmente, cavalos e, em menor proporção, cães, gatos e bovinos. O organismo tem tropismo por pele e fios de cabelo ou pelos. Os zoósporos nadam quimiotaticamente até essas estruturas, se encistando e produzindo tubos germinativos e filamentos micelianos. Em seguida, invadem o tecido cutâneo e o subcutâneo subjacente. Ao se espalharem, costumam atacar e destruir os endotélios dos vasos.

Clínica e patologia

A pitiose é uma doença crônica, com ocorrência em praticamente todo o ano, contudo, com maior incidência em épocas de elevada precipitação pluviométrica. Essa enfermidade tem várias apresentações clínicas como lesões granulomatosas cutâneas e subcutâneas e formas oculares, vasculares e disseminadas. As lesões cutâneas, que podem ser localizadas ou exibir tendência ao aprofundamento, são dolorosas e apresentam gangrena, pústulas, nódulos, úlceras ou celulites na face e nos membros inferiores. A doença ocular aparece, normalmente, como uma queratite com úlcera e perfuração de córnea. Com frequência, a forma ocular é decorrente de traumatismos periorbitários que mostram rápido e progressivo desenvolvimento acompanhado de edema, quemose, eritema e celulite. A doença vascular pode afetar artérias importantes como a femoral, ilíaca, poplítea e aorta abdominal. Nesses casos, apresenta-se como uma s***ín***drome progressiva de insuficiência arterial dos membros inferiores com febre, dor, trombose, infarto tecidual, isquemias, aneurismas, hemorragias, lesões necróticas e ulceradas, claudicação intermitente e arterite crônica. Estudos angiográficos dos pacientes revelam importante obstrução arterial. A forma vascular está mais associada a indivíduos que apresentam a talassemia como doença de base. A doença disseminada é pouco frequente e tem sido relacionada com imunocomprometimento decorrente de neoplasias e também talassemia.

Diagnóstico laboratorial

Importa mencionar que *P. insidiosum* é crio-sensível, dessa forma, a amostra clínica não deve ser refrigerada para envio ao laboratório de micologia médica.

- **Exame direto e histopatologia:** o exame direto das amostras clínicas com KOH 10% a 20% revela hifas hialinas (3-10 μm), esparsamente septadas com ramificações irregulares. A histopatologia com hematoxilina e eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS) ou Giemsa revela arterite necrosante, granulomas com predomínio de eosinófilos, infiltrado misto (eosinófilos, linfócitos, neutrófilos, polimorfonucleares), fenômeno de Splendore-Hoeppli, trombose e invasão vascular pelos elementos hifálicos que se mostram espessos, irregulares e com diâmetros de 3-20 μm.
- **Cultura:** *Pythium insidiosum* cresce bem nos meios de rotina laboratorial, como o ágar Sabouraud dextrosado

(SDA) e o ***á***gar infusão de cérebro-coração (BHIA), à temperatura de 37 °C. Após 24 horas de incubação, é possível verificar a presença de colônias de coloração branco-amarelado e aspecto flocoso com 20 mm de diâmetro. A micromorfologia revela a presença de hifas hialinas grossas (4-10 μm), raras septações e ramificações irregulares. Zoosporângios contendo zoósporos com flagelos duplos são formados em meios líquidos com folhas de Gramíneas, tal como o meio de água e o ágar-água, a 37 °C.

- **Sorologia e biologia molecular:** provas de imunoeletrotransferência (*immunoblot*), imunodifusão e imunofluorescência têm sido empregadas. Para provas de biologia molecular, tem sido realizado com sucesso o sequenciamento de rDNA de subunidade 18S (região ITS-5.8S), em amostras de tecido ou cultura.

Diagnóstico diferencial

A pitiose deve ser diferenciada de quadros de gangrena bacteriana, zigomicose cutânea e subcutânea, esporotricose, micetoma e neoplasias.

Prognóstico e tratamento

O prognóstico é reservado e ruim. A doença pode complicar com trombose de vasos de grande calibre, formação de aneurismas e hemorragias profusas e fatais. O tratamento das formas cutâneas e subcutâneas inclui cirurgia e desbridamento combinados com itraconazol, terbinafina, caspofungina, anfotericina B ou iodeto de potássio (controverso). Tratamento não conservante (amputação) pode ser necessário. A forma ocular pode requerer a queratoplastia associada a cetoconazol, itraconazol, miconazol, anfotericina B ou natamicina, 5-fluorocitosina, caspofungina, terbinafina ou iodeto de potássio, tópicos ou sistêmicos. Não é incomum a enucleação. A terapia fotodinâmica tem sido proposta para tratamento da pitiose, em decorrência da pouca opção terapêutica.

PITIRÍASE VERSICOLOR E INFECÇÕES ASSOCIADAS À *MALASSEZIA* SPP.

Etiologia e epidemiologia

A pitiríase versicolor é uma micose superficial que se caracteriza por apresentar uma evolução crônica e assintomática com alterações de natureza cosmética. Classicamente, as lesões são encontradas em áreas do corpo humano ricas em glândulas sebáceas, exibindo um aspecto arredondado com modificações na pigmentação e descamação. O agente etiológico dessa condição clínica é a *Malassezia* sp., um microrganismo dependente de lipídios que pertence à microbiota da pele. *Malassezia furfur, Malassezia globosa, Malassezia obtusa, Malassezia restricta, Malassezia slooffiae* e *Malassezia simpodialis* são as espécies patogênicas para o homem atualmente consideradas dentro desse gênero. *Malassezia pachydermatis é outra* espécie com capacidade patogênica, mas que difere das demais por não ser lipofílica e estar mais associada à enfermidade animal. Recentemente, através de técnicas moleculares, *Malassezia dermatis, Malassezia nana, Malassezia japonica* e *Malassezia equi* foram também descritas. A micromorfologia desses organismos é composta por células de levedura de aspecto esférico, ovalado ou cilíndrico, que medem 2 a 5 μm de diâmetro e apresentam um espessamento da parede celular (colarete), em consequência de gemulações unipolares repetidas ou simpodiais, bem como hifas septadas curtas e curvas com 2 a 3 μm de largura. A doença parece ocorrer quando o fungo altera sua morfologia nos tecidos, passando de elementos leveduriformes colonizantes a formas miceliais patogênicas que são capazes de invadir todo o estrato córneo, atingindo os queratinócitos. A pitiríase versicolor é um processo comumente observado em adolescentes e adultos jovens, devido a mudanças hormonais e maior atividade das glândulas sebáceas. Crianças e idosos são normalmente menos afetados. Não há distinção entre as etnias e ambos os sexos são acometidos. A doença é de distribuição universal, sendo mais prevalente em regiões de clima tropical (40% a 60%), com maior incidência nos meses de verão. Áreas subtropicais e temperadas exibem reduzidas taxas de morbidade (1% a 4%).

Clínica e patologia

A presença de manchas que variam quanto à forma, ao tamanho e coloração é o aspecto clínico mais relevante dessa dermatomicose. De maneira geral, as lesões podem se apresentar hipo ou hiperpigmentadas, com suave descamação furfurácea e leve prurido. Moderada hiperqueratose e acantose podem ser observadas. Tendo em vista a afinidade lipídica dos agentes etiológicos, a localização dessas lesões segue, normalmente, a distribuição das glândulas sebáceas sobre a pele. Assim, tipicamente, a doença surge como pequenas pápulas ou máculas esbranquiçadas, pardo-amareladas, marrons, rosáceas ou avermelhadas e escamosas que, lentamente, coalescem formando grandes áreas de tecido cutâneo alterado na região da face, pescoço, ombros, braços, tronco e abdômen.

A pitiríase versicolor é uma infecção endógena, não sendo um processo contagioso e, portanto, não adquirida em regiões praianas ou litorâneas. A doença também não está associada com baixos níveis de higiene ou asseio pessoal dos indivíduos acometidos. Os principais fatores predisponentes parecem ser a temperatura e umidade elevadas, oclusão da pele por cosméticos e roupas, que levam a modificações na concentração de CO_2, pH e microbiota, uso de contraceptivos orais, corticosteroides e imunossupressores sistêmicos, estados de desnutrição, dermatite seborreica, síndrome de Cushing e hiperidrose, além do histórico familiar.

O mecanismo pelo qual essas alterações tegumentares ocorrem é, ainda, controverso. Contudo, processos físicos e bioquímicos parecem estar envolvidos. Lesões hipopigmentadas podem ser produzidas pelo chamado "fenômeno de filtro solar", barreira formada pelo crescimento do microrganismo sobre a superfície cutânea, que impede o contato com a luz ultravioleta, produzindo áreas mais claras. Potentes filtros contra a radiação ultravioleta são também os derivados do triptofano sintetizados pela *Malassezia* spp. durante a infecção. A formação de ácidos dicarboxílicos (principalmente ácido azelaico) pela oxidação fúngica dos ácidos graxos insaturados

da pele, tem sido também associada às lesões acromiantes da pitiríase versicolor. Os ácidos dicarboxílicos agem como inibidores competitivos da dopa-tirosinase, que é a enzima que catalisa a reação da tirosina em melanina, despigmentando a região afetada. Além disso, efeitos tóxicos específicos para os melanócitos com vacuolização de mitocôndrias e degeneração celular têm sido atribuídos à presença desses ácidos. A produção de lipoperóxidos pela ação de lipoxigenases de *Malassezia* spp. sobre os lipídios teciduais é outro mecanismo relacionado ao aparecimento de lesões pouco pigmentadas. Esses radicais são altamente reativos e igualmente citotóxicos para os melanócitos, levando a uma desorganização estrutural e funcional das lipoproteínas celulares e da membrana. O bloqueio da transferência de melanossomas dos melanócitos para os queratinócitos, e a redução anormal de seu tamanho, parecem ser mais um fator de acromia ou hipopigmentação.

A patogênese das lesões hiperpigmentadas de pitiríase versicolor, por sua vez, está relacionada ao espessamento do estrato córneo, presença de grande número de leveduras e hifas, reação inflamatória pronunciada com importante infiltrado celular e hipertrofia, e alteração na formação e distribuição dos melanócitos e melanossomas. Ainda associado à hiperpigmentação, está o aumento da produção de melanina nos locais lesionados como resposta dos melanócitos à inflamação.

O comprometimento da queratinização é também outra consequência da infecção por *Malassezia* sp. As formas miceliais dos patógenos são capazes de invadir o estrato córneo intra e extracelularmente. A invasão dos queratinócitos resulta em destruição de seu direcionamento nas camadas superficiais e intermediárias da pele, bem como em perda da estrutura de queratina, organelas e matriz celular. O conteúdo de queratina da célula parasitada pode ser substituído por material lipodenso e amorfo, e glóbulos lipídicos podem surgir no tecido entre os queratinócitos, alterando a fisiologia da pele.

Malassezia spp. são parte da microbiota tegumentar, residindo no estrato córneo e folículo piloso onde ácidos graxos e triglicerídeos livres proporcionam um adequado microecossistema. Devido a essa localização, a resposta imunológica é mínima na pitiríase versicolor. No entanto, um infiltrado inflamatório perivascular pode estar presente e conter células plasmáticas, histiócitos e linfócitos. Células de Langerhans são também encontradas em grande número na epiderme. Na literatura, apesar da falta de consenso sobre a importância da imunidade humoral na defesa contra essa dermatomicose, há relatos da produção de anticorpos e da ativação das duas vias do complemento por essa levedura.

Diagnóstico laboratorial

- **Exame microscópico direto e histopatologia:** um diagnóstico presuntivo, com alto grau de confiabilidade, pode ser estabelecido a partir do exame direto dos *espécimens* de pele, obtidos por raspagem ou fita gomada, nas áreas afetadas. Empregando-se KOH a 10% a 20% ou solução de Albert, é possível detectar a presença de células de levedura globosas, ovaladas ou cilíndricas, unibrotantes e com um colarete em seu polo mais estreito, blastósporos e pequenas hifas septadas. Um clássico padrão micromorfológico, que exibe uma aparência de "almôndegas e espaguete" ou "uvas e bananas", produzido nos tecidos pelos elementos leveduriformes arranjados em cachos e os filamentos miceliais, pode ser observado, ajudando na confirmação do diagnóstico. A adição de tinta de Parker ao KOH pode ser procedida para aumentar o rendimento dessa prova. Da mesma forma, um exame direto com branco de calcoflúor pode ser realizado, se um microscópio de fluorescência estiver disponível. O estudo histopatológico das lesões cutâneas pode ser útil no diagnóstico de pitiríase versicolor. A coloração pelo PAS ou pela prata permite a observação de grande quantidade de elementos fúngicos nas camadas mais superficiais do estrato córneo e dentro dos queratinócitos. O uso da lâmpada de Wood para a confirmação do diagnóstico, detecção de lesões subclínicas ou inaparentes e seguimento do paciente tem sido proposto. Todavia, em somente 1/3 dos casos a resposta é positiva. Essa técnica é de emprego limitado porque apenas a *M. furfur* sintetiza derivados indólicos e outros fluorocromos (pitirialactona) que produzem fluorescência amarelada ou amarelo esverdeada, quando a luz ultravioleta é aplicada sobre as lesões. O Sinal de Besnier (sinal da unhada) e o Sinal de Zileri têm sido também utilizados para a confirmação do diagnóstico, pelo aumento da descamação furfurácea, após suave raspagem ou estiramento das áreas afetadas.
- **Cultura:** o isolamento de *Malassezia* spp. não é indispensável ao diagnóstico de pitiríase versicolor, já que seu aspecto histopatológico é típico. No entanto, para a diferenciação das espécies, a cultura é necessária. Classicamente, o isolamento primário dessa levedura tem sido realizado a partir da inoculação das escamas de pele em ágar Sabouraud dextrosado (SDA), ágar malte, ágar peptona-extrato de levedura-glicose, ou ágar mycosel, acrescidos de azeite de oliva recobertos também por uma fina camada de azeite de oliva estéril, para a suplementação lipídica, e incubados a 37 °C, por 10 a 15 dias. A maior limitação dessa metodologia é a perda de viabilidade de algumas espécies de *Malassezia*. Em decorrência disso, outros meios de cultura mais complexos são requeridos. O meio de Dixon modificado e o meio de Leeming e Notman têm sido largamente empregados com adequado crescimento e altas taxas de recuperação. Para assegurar um ótimo isolamento, esses meios devem ser mantidos a 32 °C -35 °C, por 3 a 7 dias (ou até 15 dias), em uma atmosfera saturada de umidade.

A identificação das espécies é feita com base no exame de suas características morfofisiológicas (Quadros 63.6 e 63.7). Desse modo, a partir do isolamento primário, subcultivos para o meio de Dixon modificado (ou Leeming e Notman) devem ser realizados, a fim de se obter culturas puras e proceder a análise da morfologia, considerando o diâmetro e textura das colônias, o aspecto das células de levedura, a natureza da

Quadro 63.6 Chave de classificação das para as espécies de *Malassezia*.

1a.	Crescimento em *ágar* peptona-glicose	*M. pachydermatis*
1b.	Ausência de crescimento em *ágar* peptona-glicose	2
2a.	Reação da catalase positiva	3
2b.	Reação da catalase negativa	*M. restricta*
3a.	Crescimento em *ágar* peptona-glicose com 0,5% de Tween 40 ou 60	4
3b.	Ausência de crescimento em *ágar* peptona-glicose com 0,5% de Tween 40 ou 60	5
4a.	Crescimento em *ágar* peptona-glicose com 0,1% de Tween 80	6
4b.	Ausência de crescimento em *ágar* peptona-glicose com 0,1% de Tween 80	*M. slooffiae*
5a.	Células alongadas, cilíndricas e crescimento a 37°C	*M. obtusa*
5b.	Células esféricas, usualmente sem crescimento a 37°C	*M. globosa*
6a.	Crescimento em *ágar* peptona-glicose com 10% de Tween 20	*M. furfur*
6b.	Ausência de crescimento em ***ágar*** peptona-glicose com 10% de Tween 20	*M. sympodialis*

Quadro 63.7 Resumo das características morfofisiológicas das sete espécies de *Malassezia*.

Provas	*M. pachydermatis*	*M. restricta*	*M. slooffiae*	*M. obtusa*	*M. globosa*	*M. furfur*	*M. sympodialis*
Colônia	Convexa, lisa, macia e friável	Fosca, lisa, dura e quebradiça	Dobrada e quebradiça	Lisa, plana e úmida	Rugosa, úmida e quebradiça	Umbonada, lisa, macia e friável	Plana, lisa, brilhante e macia
Coloração	Creme	Creme	Creme a amarelada	Creme	Creme a amarelada	Creme	Creme a amarelada
Células	Cilíndricas (2,5-4,0 µm)	Esféricas ou ovais (2,0-4,0 µm)	Cilíndricas (1,5-3,5 µm)	Cilíndricas (4,0-6,0 µm)	Esféricas (6,0-8,0 µm)	Alongadas, ovais ou esféricas (6 µm)	Ovoides ou globosas (2,5-5,0 µm)
Gemulação	Base de inserção larga com pronunciada cicatriz	Base de inserção estreita	Base de inserção larga	Base de inserção larga	Base de inserção estreita	Base de inserção larga	Simpodial
Conteúdo GC	55,6%	59,9%	68,7%	60,7%	53,5%	66,4%	62,2%
Catalase	(v)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
DBB	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Urease	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Crescimento em 37°C	Bom	Pobre	Bom	Pobre	Pobre	Bom	Bom
Termotolerância	40-41 °C	38 °C	40-41 °C	38 °C	38 °C	40-41 °C	40-41 °C
Tween 20	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
Tween 40/60	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
Tween 80	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
Cremofor EL	(v)	(-)	(-)	(-)	(-)	(v)	(-)
Esculina	(v)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)

parede celular, a produção de blastósporos por gemulação monopolar ou simpodial e a presença de colarete. Por sua vez, o estudo das características fisiológicas incluem o crescimento em substratos não lipídicos, a reação da catalase, a atividade da b-glucosidase (prova da esculina), a utilização de Tween 20, 40, 60 e 80 como única fonte de lipídios, a seletividade para o Cremophor EL, a hidrólise da ureia, o teste com o azul de diazônio B e a termotolerância (32 ºC, 37 ºC, 40 ºC).

A taxonomia dos agentes etiológicos da pitiríase versicolor foi motivo de grande controvérsia, até recentemente. Envolvidos nessa problemática, estavam os gêneros *Pityrosporum* (Sabouraud, 1904) e *Malassezia* (Baillon, 1889). Na realidade, as dificuldades na classificação desses fungos eram basicamente decorrentes do seu próprio comportamento morfológico. Como a *Malassezia* sp. é um fungo que exibe tanto uma forma de levedura quanto uma forma filamentosa, por muito tempo essas duas morfologias foram consideradas organismos distintos. A fase leveduriforme caracterizava o gênero *Pityrosporum* e aquela composta por elementos miceliais teciduais estava relacionada ao gênero *Malassezia*.

Dentro do gênero *Pityrosporum*, duas espécies patogênicas para os seres humanos eram reconhecidas: o *Pityrosporum ovale,* que apresentava células de levedura ovaladas ou cilíndricas e gemulação com uma base de inserção larga, e o *Pityrosporum orbiculare,* cujas células eram globosas e apresentavam gemulações com uma estreita base de inserção. Além da morfologia, essas espécies também mostravam padrões epidemiológicos diferentes. O *P. ovale* (formas 1,2,3) era comumente observado na face e couro cabeludo, causando caspa e dermatite seborreica, enquanto o *P. orbiculare* era mais encontrado no tronco, causando pitiríase versicolor. Contudo, diversos estudos laboratoriais relatavam uma interconversão entre essas espécies, principalmente das cepas globosas (*P. orbiculare*) para as ovoides ou cilíndricas (*P. ovale*), o que levou à teoria de que essas espécies poderiam ser distintas formas de um mesmo organismo.

No caso do gênero *Malassezia*, as duas espécies aceitas nesse grupo eram a *Malassezia furfur* e a *Malassezia pachydermatis*. Todavia, apenas a *M. furfur* estava associada à pitiríase versicolor. Micopatologicamente, essa espécie era caracterizada por apresentar *células de levedura*, esféricas ou ovaladas, com hifas septadas pequenas e curvas, e por apresentar três diferentes sorovares (A, B, C). O estudo das variações morfológicas, fisiológicas e imunológicas da *M. furfur* geraram mudanças tanto na taxonomia do gênero *Malassezia* quanto do gênero *Pityrosporum*.

Apesar de ter sido amplamente aceita a suposição de que havia um relacionamento muito próximo entre as formas leveduriformes e miceliais dos gêneros *Malassezia* e *Pityrosporum*, essa suspeita não pôde ser comprovada porque a conversão entre elas não foi prontamente demonstrada. No entanto, recentemente, essa questão foi solucionada quando formas miceliais idênticas àquelas observadas nos tecidos foram obtidas de ambas as formas leveduriformes (globosas e ovaladas) *in vitro*. Com isso, ficou definido que essas diferenças morfofisiológicas representavam apenas fases do ciclo biológico de um mesmo fungo. Consecutivamente, o termo *Pityrosporum* tornou-se sinônimo de *Malassezia*. Assim, *P. ovale* (formas 1, 2 e 3) *e P. orbiculare* foram incluídos em *M. furfur* e *P. pachydermatis* foi incorporado por *M. pachydermatis*.

A despeito da definição da etiologia da pitiríase versicolor, a taxonomia do gênero *Malassezia* continuava a conter elementos de controvérsia. Durante algum tempo, *M. furfur* (sorovares A, B, C) foi considerada a única espécie patogênica para o homem. Entretanto, a avaliação dos conteúdos de bases nitrogenadas G+C e a presença de gemulação do tipo simpodial determinaram, inicialmente, a criação de uma nova espécie, a *M. sympodial* (*P. ovale* forma 3 ® *M. furfur* sorovar A). Outros estudos morfológicos, fisiológicos e moleculares permitiram também a criação de mais quatro espécies: *M. globosa* (*P. orbiculare*® *M. furfur* sorovar B), *M. restricta* (*M. furfur*® *M. furfur* sorovar C), *M. obtusa (P. ovale* forma 2*)* e *M. slooffiae (P. ovale* forma 1*)*. Atualmente, esse gênero conta com sete espécies, seis associadas a dermatomicoses humanas e uma (*M. pachydermatis*) ligada à doença animal (Quadros 63.6 e 63.7).

Malassezia (Baillon, 1889)

- **Taxonomia:** Filo Basidiomycota, Classe Ustilaginomycetes, Ordem Malasseziales.
- **Morfofisiologia:** as colônias são pequenas, cremes a amareladas, lisas ou levemente rugosas, brilhantes ou foscas e lobuladas. A reprodução assexuada ocorre por gemulação unipolar recorrente ou simpodial. As leveduras em forma de garrafa podem ser globosas, ovoides ou cilíndricas. A separação da gêmula (célula filha) deixa uma cicatriz, formando um pequeno colar (colarete), após as sucessivas gemulações. Hifas podem ser produzidas em cultura. A parede celular é espessa e multilamelar com aspecto serrilhado. A levedura é capaz de assimilar ácidos graxos de cadeia longa como única fonte de carbono e o crescimento pode ser estimulado por óleos naturais como o azeite de oliva. Não fazem fermentação. A hidrólise da ureia *é evidente e a reação da catalase é positiva. A reprodução sexuada ainda não foi descrita*.

Malassezia pachydermatis (Weidman) (Dodge, 1935)

- **Morfologia:** após 7 dias de incubação, a 32 ºC, em *ágar* peptona-glicose, as colônias se apresentam foscas, convexas, algumas vezes umbonadas, com coloração creme, textura macia ou friável e diâmetro aproximado de 5,0 μm. As células de levedura são ovoides (2,0 a 2,5 × 4,0 a 5,0 μm) e a base de inserção entre a célula parental (célula mãe) e a gêmula é larga, produzindo uma proeminente cicatriz.

- **Fisiologia:** A reação da catalase é, usualmente, positiva e são positivas também as reações da urease e Diazônio Azul B (DBB). O crescimento do fungo é inibido com a incorporação de 10% de Tween 20 ao ágar peptona-glicose. A *M. pachydermatis* cresce a 37 °C e tolera temperaturas de até 40 °C-41 °C. As células dessa espécie sobrevivem à liofilização e seu conteúdo de GC está em torno de 55,6% ± 0,2%. A fase teleomórfica é desconhecida.

Malassezia restricta (Guého, Guillot & Midgley, 1996).

- **Morfologia:** após 7 dias de incubação, a 32 °C, em *ágar* Dixon modificado, as colônias se apresentam foscas, lisas a rugosas (em sua borda), com textura dura e quebradiça e diâmetro aproximado de 3,0 µm. As células de levedura são esféricas a ovais (1,5-2,0 × 2,5-4,0 µm) e a base de inserção entre a célula parental e a gêmula é relativamente estreita.
- **Fisiologia:** a reação da catalase é negativa, todavia, as reações da urease e Diazônio Azul B (DBB) são positivas. O crescimento do fungo não ocorre em *ágar* peptona-glicose suplementado com 0,1% a 10% de Tween 20, 40, 60 e 80 como única fonte de lipídios. A *M. restricta* cresce a 37 °C e tolera temperaturas de até 38 °C -39 °C. As células sobrevivem inconstantemente à liofilização e seu conteúdo de GC está em torno de 59,9% ± 0,1%. A fase teleomórfica é desconhecida.

Malassezia slooffiae (Guého, Guillot & Midgley, 1996)

- **Morfologia:** após 7 dias de incubação, a 32 °C, em *ágar* Dixon modificado, as colônias se apresentam rugosas com finos sulcos, textura áspera e diâmetro aproximado de 3,0 µm. As células de levedura são pequenas e cilíndricas (1,0 a 2,0 × 1,5-4,0 µm) e a base de inserção entre a célula parental e a gêmula é larga.
- **Fisiologia:** a reação da catalase é positiva, bem como as reações da urease e Diazônio Azul B (DBB). O crescimento do fungo ocorre em *ágar* peptona-glicose suplementado com 0,1% a 10% de Tween 40 e 60 como única fonte de lipídios. No entanto, o crescimento não é observado com a suplementação de 0,1% de Tween 80. Para alguns isolados, nenhum crescimento é verificado em altas concentrações (10%) de Tween 20 no meio cultura. A *M. slooffiae* cresce a 37 °C e tolera temperaturas de até 40 °C. As células dessa espécie sobrevivem à liofilização e o conteúdo de GC está em torno de 68,7% ± 0,1%. A fase teleomórfica é desconhecida.

Malassezia obtusa (Guého, Guillot & Midgley, 1996)

- **Morfologia:** após 7 dias de incubação, a 32 °C, em *ágar* Dixon modificado, as colônias se apresentam lisas, planas, com textura úmida e diâmetro aproximado de 4,0 µm. As células de levedura são grandes e cilíndricas (1,5-2,0 × 4,0-6,0 µm) e a base de inserção entre a célula parental e a gêmula é larga. Filamentos ramificados podem ocorrer em qualquer ponto da superfície da célula parental.
- **Fisiologia:** a reação da catalase é positiva, bem como as reações da urease e Diazônio Azul B (DBB). O crescimento do fungo não é observado em *ágar* peptona-glicose suplementado com 0,1% a 10% de Tween 20, 40, 60 e 80 como única fonte de lipídios. A *M. obtusa* cresce a 37 °C e tolera temperaturas de até 38 °C. As células sobrevivem inconstantemente à liofilização e seu conteúdo de GC está em torno de 60,7%. A fase teleomórfica é desconhecida.

Malassezia globosa (Guého, Guillot & Midgley, 1996).

- **Morfologia:** após 7 dias de incubação, a 32 °C, em *ágar* Dixon modificado, as colônias se apresentam elevadas, dobradas e rugosas, com textura áspera e quebradiça e diâmetro aproximado de 4,0 µm. As células de levedura são esféricas (2,5 × 4,0 µm) e a base de inserção entre a célula parental e a gêmula é estreita. Cicatrizes de gemulação, ao contrário de outras espécies, não são proeminentes. Pequenos filamentos são, algumas vezes, formados no local de origem das gêmulas. Ramificações podem ocorrer no ponto de inserção entre a célula parental e a gêmula. Algumas células filhas podem alongar-se, mas a base de inserção se mantém sempre mais estreita do que a gêmula, produzindo um aspecto característico.
- **Fisiologia:** a reação da catalase é positiva, bem como as reações da urease e Diazônio Azul B (DBB). O crescimento do fungo não é observado em *ágar* peptona-glicose suplementado com 0,1% a 10% de Tween 20, 40, 60 e 80 como única fonte de lipídios. A *M. globosa* não cresce a 37 °C ou se mantém muito incipiente. As células dessa espécie não sobrevivem à liofilização e seu conteúdo de GC está em torno de 53,5%. A fase teleomórfica é desconhecida.

Malassezia furfur (Robin) (Baillon, 1889)

- **Morfologia:** após 7 dias de incubação, a 32 °C, em *ágar* Dixon modificado, as colônias se apresentam foscas, lisas, umbonadas, suavemente dobradas, com elevação convexa, textura macia ou friável e diâmetro aproximado de 5,0 µm. As células de levedura são variáveis no tamanho e morfologia, apresentando um aspecto esférico (2,5 × 5,0 µm), cilíndrico (1,5-3,0 × 2,5-8,0 µm) e oval. A base de inserção entre a célula parental e a gêmula é larga. Filamentos ramificados podem ocorrer em qualquer ponto da célula parental.
- **Fisiologia:** a reação da catalase é positiva, bem como as reações da urease e Diazônio Azul B

(DBB). O crescimento do fungo não é observado em *ágar* peptona-glicose suplementado com 0,1%, 0,5%, 1,0%, 5,0%,10% de Tween 20, 40, 60 ou 80 como única fonte de lipídios. A *M. furfur* cresce a 37 °C e tolera temperaturas de até 40 °C-41 °C. As células dessa espécie sobrevivem à liofilização e seu conteúdo de GC está em torno de 66,4% ± 0,3%. A fase teleomórfica é desconhecida.

Malassezia sympodialis (Simmons & Guého, 1990)

- **Morfologia:** após 7 dias de incubação a 32 °C em *ágar* Dixon modificado, as colônias se apresentam brilhantes, lisas, planas, com leve elevação central, textura macia e diâmetro aproximado de 5,0 µm. As células de levedura são ovoides a globosas (1,5-2,5 × 2,5-6,0 µm) e a base de inserção entre a célula parental e a gêmula é estreita. Gemulações repetidas ou simpodiais são encontradas.
- **Fisiologia:** a reação da catalase é positiva, bem como as reações da urease e Diazônio Azul B (DBB). O crescimento do fungo não é observado em *ágar* peptona-glicose suplementado com 0,1% a 10% de Tween 40, 60 e 80 como única fonte de lipídios. A *M. sympoialis* cresce a 37 °C e tolera temperaturas de até 40 °C-41 °C. As células dessa espécie sobrevivem à liofilização e seu conteúdo de GC está em torno de 54,0% ou 66,2% ± 0,4%, segundo alguns autores. A fase teleomórfica é desconhecida.

Diagnóstico diferencial

Aquelas dermatopatias que também produzem alterações na pigmentação da pele devem ser diferenciadas de pitiríase versicolor. Nesse sentido, são particularmente importantes o vitiligo e a pitiríase alba, que podem ser excluídos pela ausência de descamação furfurácea e não observação de fluorescência à luz ultravioleta. Devem ser ainda considerados a *Tinea corporis*, dermatite seborreica, eritrasma (fluorescência vermelho-coral), sífilis secundária, papilomatose confluente e reticulada, pitiríase rósea, pitiríase rotunda e cloasma.

Prognóstico e tratamento

A doença tem bom prognóstico, mas a presença de fatores predisponentes pode dificultar sua erradicação, tornando a pitiríase versicolor um processo crônico e recorrente. Não obstante as recidivas, a *Malassezia* spp. é susceptível a uma grande variedade de agentes antifúngicos tópicos e orais, disponível comercialmente. Dentre as medicações de uso local, destacam-se as formulações não específicas como o sulfeto de selênio, tiossulfato de sódio com ácido salicílico, ácido benzoico com ácido salicílico, enxofre com ácido salicílico, propilenoglicol e iodo-povidine. Essas substâncias não agem diretamente sobre o fungo, mas promovem a retirada física e química do tecido lesionado e/ou afetam a taxa de *turnover* celular. Os antifúngicos específicos de aplicação tópica incluem os derivados azólicos (cetoconazol, clotrimazol, itraconazol, miconazol, econazol, pramiconazol e tioconazol), tiocarbamatos, tolnaftato, tolciclato, terbinafina e griseofulvina. Medicações sistêmicas podem ser empregadas, quando grandes áreas da pele são afetadas e/ou quando há recorrências. Os antifúngicos orais de escolha são cetoconazol, fluconazol e itraconazol. Terbinafina e griseofulvina, no entanto, não são efetivos *per os*. A terapia profilática com cetoconazol tem sido considerada para aqueles pacientes com história de falhas no tratamento e retorno à condição clínica. Frequentemente, a cura micológica não é acompanhada da pronta resolução das lesões tegumentares.

Outras infecções associadas à *Malassezia* spp.

- ***Foliculite:*** o aspecto clínico mais evidente desse processo é a presença de pápulas e pústulas que ocorrem, principalmente, na região dos membros superiores e tronco e que podem ser assintomáticas ou prurídicas. Nódulos e cistos podem surgir nos casos mais graves. Como em pitiríase versicolor, a foliculite por *Malassezia* está associada à colonização dos tecidos pela levedura. A oclusão do folículo piloso com posterior invasão fúngica explica essa condição. Em parte, a inflamação e irritação observadas são decorrentes da produção de ácidos graxos por ação de lipases da *Malassezia* spp. sobre os triglicerídeos da pele. A histopatologia das lesões revela um infiltrado celular composto por linfócitos, histiócitos e neutrófilos e elementos leveduriformes esféricos e gemulantes, e pequena quantidade de hifas. No folículo piloso, podem ser também encontradas bactérias como as propionibactérias e *Staphylococcus* sp. Um outro aspecto histológico característico é a distensão do folículo piloso, seu preenchimento com material queratínico, e eventual ruptura do epitélio. Comumente, a doença aparece como complicação naqueles pacientes que apresentam processos de base consumptivos (Aids, leucemia, doença de Hodgkin e *diabetes mellitus*) ou sob terapia com antibióticos e imunossupressores ou, ainda, submetidos a transplantes de medula óssea e órgãos (coração e rins). A foliculite por *Malassezia* spp. *é mais prevalente em áreas tropicais (16%), sendo favorecida pela maior temperatura e* umidade elevadas. Nas regiões temperadas, a maior incidência de foliculite se dá nos períodos de primavera verão. Essa condição responde bem à quimioterapia antifúngica tópica e/ou oral com derivados azólicos de uso clínico.
- ***Dermatite seborreica:*** a presença de descamação e inflamação em áreas do corpo ricas em glândulas sebáceas caracterizam essa patologia. As lesões são eritematosas, descamativas e, ocasionalmente, pruriginosas, distribuindo-se pelo couro cabeludo, sobrancelhas, face e junção nasolabial, ouvido, tronco (regiões intraescapular *e pré-esternal), axilas e coxas. Complicações do quadro clínico incluem* liquenificação, infecção bacteriana secundária e otite externa. A colonização pela *Malassezia* spp. e a presença de fatores predisponentes como pitiríase versicolor, distúrbios neurológicos (doença de Parkinson, esclerose múltipla e lesão da medula espinhal), esgota-

mento físico e mental e imunocomprometimento contribuem para o desencadeamento da doença. A dermatite seborreica parece ser mais decorrente de uma resposta anormal dos hospedeiros à presença da *Malassezia* na pele do que consequência de um supercrescimento da levedura no foco infeccioso. A produção de toxinas e enzimas fúngicas também tem sido considerada na patogênese dessa condição. Enzimas, como as lipases, convertem os triglicerídeos teciduais em ácidos graxos que, por apresentarem uma ação irritativa, induzem à descamação. A liberação do ácido araquidônico, por sua vez, contribui de maneira importante para o aumento do processo inflamatório nos locais de lesão. A doença é mais prevalente em homens do que em mulheres e parece sofrer influência da sazonalidade, se agravando no inverno e melhorando nos períodos de maior calor. A incidência dessa dermatite na população em geral varia de 1% a 3%, no entanto, percentuais de até 83% podem ser encontrados em pacientes com Aids. Em indivíduos normais, a dermatite seborreica tende a surgir na puberdade, em função das alterações hormonais e aumento da atividade das glândulas sebáceas, tornando-se crônica com frequentes recorrências. Nos pacientes imunocomprometidos, a doença tende a ser mais intensa e refratária à quimioterapia. Drogas antifúngicas ativas contra a *Malassezia* spp. demonstram ser efetivas no tratamento da maioria dos casos de dermatite seborreica e seu uso profilático reduz, sensivelmente, as taxas de recidiva da doença.

- ***Dermatite atópica:*** a ocorrência de um processo inflamatório crônico marcado por intenso prurido e acompanhado por lesões eczematosas com eritema, descamação e espessamento da epiderme, define clinicamente essa condição. A dermatite atópica é principalmente observada em adultos jovens do sexo feminino e tem sua maior incidência em países do Leste. Fatores predisponentes de origem genética como histórico familiar de dermatite atópica, rinite alérgica e asma brônquica desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da doença. Um outro fator de particular importância na gênese dessa dermatite é a própria *Malassezia* spp. A levedura tem sido isolada em 83% dos pacientes adultos e parece agir como um alérgeno (e não como um agente infeccioso), nos indivíduos susceptíveis, especialmente naqueles onde as lesões se localizam na cabeça e pescoço. A identificação de três componentes alergênicos associados à *Malassezia* spp., dois de natureza proteica (37kb e 67kb) e um carboidrato (14kb), tem sido relatada na literatura. A administração de antifúngicos azólicos e corticosteroides *tópicos e/ou orais aliviam os sintomas.*
- ***Infecções cutâneas e doença sistêmica (Malasseziose)*:** a *Malassezia* spp. tem sido também associada a uma série de outros processos tegumentares como acne vulgar, acne neonatal, blefarite seborreica, dacriocistite, infecção nodular do folículo piloso, onicomicose, papilomatose confluente e reticulada, e psoríase, bem como a diversos processos sistêmicos, incluindo artrite séptica, fungemias, mastites, peritonites e sinusites. No caso das fungemias, essas têm sido relacionadas ao emprego de cateteres venosos centrais para administração parenteral de emulsões lipídicas em pacientes prematuros e/ou imunocomprometidos. A presença da *Malassezia* spp. na corrente sanguínea pode ser explicada pelo fato da barreira cutaneomucosa ser rompida pela introdução do cateter, permitindo que o fungo colonizante atinja a circulação e se mantenha no foco infeccioso, pelo suprimento lipídico que está sendo oferecido. O comprometimento imunológico dos pacientes colabora para o estabelecimento e persistência da infec*ção*. O eventual isolamento da levedura e/ou a resposta à quimioterapia antifúngica são os principais argumentos para a confirmação da *Malassezia* spp. como agente etiológico dessas diferentes condições clínicas.

PNEUMOCISTOSE

Etiologia e epidemiologia

O *Pneumocystis jirovecii*, anteriormente identificado como *Pnemocystis carinii* e classificado como um protozoário, é um microrganismo com características atípicas e intermediárias entre os fungos e os parasitas. O *P. jirovecii* tem sido considerado um fungo filogeneticamente próximo ao *Saccharomyces cerevisiae* e a outras leveduras. Esse organismo não é cultivável em meios tradicionais e seu ciclo de vida apresenta tanto uma fase sexuada e quanto uma fase assexuada. O ciclo vital é composto por dois estágios fundamentais representados pelos trofozoítos (forma trófica) e pelos cistos maduros (ascos), que parecem ser estruturas de propagação e infectividade. Os trofozoítos são haploides, uninucleados, apresentam uma morfologia variável, elipsoide ou ameboide, medem 1,5-5 µm de diâmetro e têm parede celular delgada (ou ausente) com projeções citoplasmáticas denominadas filopódios. Nos tecidos, esses organismos fúngicos se distribuem, formando *clusters*. A fase de trofozoítos é o estágio mais abundante em todo o ciclo de vida e de infecção fúngica (cerca de 90% a 95% dos elementos pulmonares), exibindo a proporção de 10:1 em relação aos cistos. Esses trofozoítos se originam diretamente de cistos maduros, que representam a fase sexuada do fungo. Os trofozoítos haploides se dividem por fissão binária ou endogenia, formando, assexuadamente, novos trofozoítos. No entanto, essas estruturas podem também parear e se conjugar, em decorrência de tipos sexuais ou conjugantes (*mating types*) compatíveis, dando origem a uma célula uninucleada, diploide, de aspecto esférico e de paredes delgadas, denominada esporozoíto inicial. O esporozoíto inicial entra num processo de divisão meiótica, que ocorre em dois ciclos (meiose I e II) e produz três divisões nucleares, originando um zigoto com quatro núcleos. De forma eventual, os trofozoítos que se conjugaram e se tonaram diploides podem se reproduzir de maneira assexuada como os trofozoítos haploides. Simultaneamente à replicação meiótica e à segregação de organelas celulares, ocorre o surgimento de uma outra camada ou lâmina

próximo à membrana citoplasmática, engrossando sua parede. Nesse estágio, o esporozoíto é denomidado de esporozoíto intermediário. A meiose é seguida, então, por uma divisão mitótica adicional, resultando em oito núcleos, contidos numa grande célula esférica. Nesse momento, o esporozoíto passa a ser chamado de esporozoíto tardio. Nessa fase, tem início um processo de delimitação celular que formam oito esporos ou corpos intracísticos. A parede do esporozoíto tardio começa a se espessar para, finalmente, produzir um cisto esférico ou semilunar, de paredes lisas e grossas, com raros filopódios e que mede 8-10 μm de diâmetro. O conteúdo núclear dos cistos pode ser diploide, tetraploide ou octoploide. No cisto maduro, oito esporos individuais (ascósporos) de aspecto irregular, esférico, elipsoide ou ameboide são claramente delineados e protegidos por uma parede celular que apresenta espessura semelhante à espessura da parede celular da forma trófica. Esses esporos exibem um único núcleo e um citoplasma denso com uma mitocôndria bem definida, um retículo endoplasmático rugoso bastante desenvolvido e números os ribossomas. Uma vez completamente amadurecidos, os esporos são liberados para o meio externo (excistamento), através de um ostíolo no cisto, originando oito formas tróficas livres, que podem recomeçar o ciclo de reprodução sexuada e assexuada. Após a saída dos esporos, os cistos vazios tomam uma forma de taça ou guarda-sol. Uma característica notável, além do não crescimento em meios de cultura usuais, é a ausência de ergosterol na membraba celular do *P. jerovecii*. Diferentemente dos outros fungos, esse organismo tem colesterol como esterol de membrana, o que confere resistência frente aos antifúngicos que agem sobre o ergosterol, notadamente, a anfotericina B.

O *P. Jorivecii* é um fungo cosmopolita, sendo reportado em todo o mundo, em áreas tropicais, temperadas e frias, excetuando-se a Antártida. Apesar de não ser cultivável e não terem sido isoladas formas ambientais de vida livre, é possível que seu *habitat* seja tanto o meio rural quanto o urbano, já que ácidos nucleicos desse fungo têm sido detectados no solo, na água, no ar e em diversos outros ambientes e superfícies, incluindo domícílios e áreas hospitalares. O reservatório conhecido desse fungo é exclusivamente o homem. A espécie humana parece ser naturalmente colonizada por esse fungo. Nesse sentido, a infecção pelo *P. jerovecii* é considerada uma antroponose. O gênero *Pneumocystis* apresenta estenoxenismo, ou seja, grande afinidade por seu hospedeiro. Em decorrência disso, existem espécies distintas de acordo com os diferentes tipos de mamíferos. Assim, o *Pneumocystis carinii* e o *Pneumocystis wakefieldiae* estão associados a camundongos, o *Pneumocystis murina* está associado a ratos, o *Pneumocystis oryctolagy* está associado a coelhos e há ainda espécies ligadas ao furão, cavalos, porcos e cães. O contágio se dá, aparentemente, pela via respiratória, através da inalação de partículas aerosolizadas, ingestão e contato com ambientes contaminados e com indivíduos colonizados, portadores assintomáticos ou mesmo com doença ativa. No entanto, como *P. Jirovecii* está presente colonizando o tecido pulmonar, a microbiota fúngica tem sido considerada também como fonte de infecção endógena. Não há distinção de sexo, contudo, como a Aids é mais incidente no sexo masculino, e sendo a infecção pelo HIV um fator predisponente para pneumocistose, esse gênero tem sido o mais acometido. A faixa etária é ampla e há relatos da doença em recém-nascidos e em indivíduos adultos. Nesses indivíduos, a faixa etária mais acometida situa-se em torno dos 30 anos. Relativamente a atividades ocupacionais, essas parecem não ter influência na taxa de aquisição da doença, mas trabalhadores da área de saúde com ocupações clínicas que levam a entrar em contato com indivíduos enfermos, podem propagar o *Pneumocystis*. A maior parte dos casos de infecção por *P. Jirovecii* está, classicamente, associada a pacientes portadores de HIV-Aids (>50%). Na atualidade, todavia, a Aids deixou de ser o principal fator predisponente, tendo em vista a instituição da HAART e da profilaxia com pentamidina e sulfonamidas. Em indivíduos sem diagnóstico definido de Aids e, por conseguinte, sem tratamento com antirretroviral, a pneumocistose apresenta percentuais de 20% a 30%. Outros fatores que predispõem à doença estão ligados a condições de neutropenia e imunocomprometimento diferentes de Aids, como neolpasias sólidas e hematológicas, pacientes transplantados, doenças respiratórias crônicas, doenças inflamatórias crônicas, doenças degenerativas, desnutrição, alcoolismo, pacientes em UTI por tempo prolongado e pacientes sob terapia com cistostáticos, corticoides, imunomoduladores e anticorpos monoclonais sintéticos. Nesses indivíduos, a taxa de infecção pode atingir percentuais de 40% a 50%. A pneumocistose pode também acometer indivíduos sem história de doença de base ou imunocompetentes. Episódios clínicos podem ocorrer por reativação de microrganismos latentes/quiescentes, por infecção primária ou por novo contágio. Tem sido proposto que, precocemente, nos primeiros meses de vida, uma primoinfecção (ou colonização) pode ser produzida em função de contaminação por via aérea ou vertical ao nascimento, tornando essas crianças portadores assintomáticos que, em momentos posteriores de imunocomprometimento, pode vir a se manifestar clinicamente. Infecção *de novo* pode também ocorrer, já que existem diferentes genótipos de *Pneumocytis* nos distintos ambientes e regiões. Disso decorre o fato de que, após a cura clínica e a eliminação do genótipo causal, nova infecção pode ocorrer por um outro genótipo. Essa diversidade genotípica, inclusive, parece estar associada a quadros clínicos específicos. Infecção *de novo* pode ainda ser desencadeada por transplante de orgão previamente contaminado. Dependendo do tamanho do inóculo e do *status* de saúde dos pacientes, o período de incubação pode variar de 3-12 semanas.

Clínica e patologia

Uma vez inalado, o *Pneumocystis* tem especial tropismo pelas células epiteliais alveolares do pulmão, sendo incomum a disseminação a outros órgãos, razão pela qual sua clínica é, essencialmente, pulmonar. O fungo liga-se fortemente às células alveolares (pneumócitos) tipo I, através de seus filopódios e, em parte, também, utilizando as proteínas da matriz extracelular. Histologicamente, se observa um exsudato in-

tralveolar espumoso e rosado, que contém os elementos fúngicos. O processo inflamatório da parede alveolar é variável, indo desde uma pequena reação até uma forte inflamação intersticial crônica e fibrose. Defeitos na imunidade mediada por células T $CD4^+$ (<200 linfócitos $CD4^+/\mu L$) tornam os hospedeiros susceptíveis à infecção pelo *Pneumocystis*. Embora a hipóxia seja fortemente marcada pela pneumocistose, suas manifestações clínicas são variáveis e seu aparecimento pode ser insidioso, com um curso evolutivo mais demorado, ou fulminante e rapidamente progressivo, ao longo de alguns poucos dias.

Nos pacientes profundamente imunocomprometidos, se observam quadros de pneumonia intersticial com infiltrados de células plasmáticas, que evoluem em 1 a 2 semanas. Os sintomas pulmonares são inespecíficos, mas, habitualmente, ocorre fadiga e perda de peso, febre moderada, dispneia, taquipneia, ortopneia, tosse não produtiva, hipoxemia, cianose e suor noturno. Em pacientes fumantes, com doença pulmonar obstrutiva crônica ou com bronquite, pode haver tosse produtiva e secreções. Nas radiografias e tomografias computadorizadas de tórax, é possível observar infiltrados difusos na região hilar e opacidade pulmonar bilateral com aspecto de vidro moído. Não há, contudo, um padrão de imagem patognomônico, e outras alterações radiográficas podem ocorrer. Para alguns pacientes, inclusive, a fase inicial da pneumocistose não mostra alterações na radiografia de tórax. É pouco frequente a ocorrência de infiltrados unilaterais ou localizados, lesões nodulares, reticulares, bolhosas e granulomatosas, cavitação, necrose, calcificação, vasculite, derrame pleural, pneumatocele e pneumotórax que, quando presente, determina dispneia aguda e dor torácica. Pacientes sob tratamento com HAART podem apresentar a Síndrome de Reconstituição Imunológica (SRI), onde há um agravamento das manifestações clínicas como tosse, dispneia, hipoxemia e infiltrados pulmonares, que costumam diminuir com a instituição de corticoterapia sistêmica. Na cintilografia pulmonar, pode-se observar, ainda, uma captação aumentada dos isótopos radioativos gálio[67] e índio.[111] A mortalidade é elevada se não for instituído tratamento antifúngico adequado, sendo a morte determinada por falência respiratória aguda. A doença extrapulmonar ocorre em 5% dos casos e têm sido relatados quadros disseminados, principalmente em pacientes em estágios avançados de Aids, apresentando nódulos de aspecto arenoso ou necrótico nos tecidos acometidos. Os principais sítios anatômicos envolvidos são gânglios linfáticos, tireoide, fígado, baço, trato gastrointestinal, ossos, medula óssea, rins, suprarrenal, olhos, ouvidos e pele.

Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de pneumocistose é basicamente realizado pela observação microscópica do fungo em amostras respiratórias, pois o fungo não é cultivável. O lavado broncoalveolar é o *espécimen* mais adequado para a pesquisa do *P. jorivecii*, por ser o mais sensível e efetivo. Escovado brônquico, aspirado transtraqueal, biópsia traqueobrônquica ou pulmonar e expectoração induzida (pacientes com Aids), todavia, podem também ser utilizados para o diagnóstico laboratorial dessa enfermidade. Auxiliares no diagnóstico são, ainda, as imagens obtidas através da radiografia e tomografia computadorizada do tórax, que exibem, em geral, infiltrados intersticiais difusos e massas mediastinais.

- **Exame direto e histopatologia:** para uma correta visualização microscópica, as amostras devem ser coradas pela técnica da prata (Gromori-Grocott), considerada padrão-ouro para fungos, que permite a detecção de cistos de coloração negra, cujo aspecto tintorial é resultado da impregnação pela prata. Outras técnicas que também podem ser empregadas para a análise da micromorfologia parasitária são o azul de ortotoluidina (cistos), Wright-Giemsa modificado (Diff-Quick) (cistos e trofozoítos), Gram-Weigert (cistos e trofozoítos), cresil violeta (cistos), hematoxilina-eosina (HE)(cistos e trofozoítos), Papanicolaou (cistos/esporozoítos e material espumoso alveolar) e branco de calcoflúor (cistos). Os achados histopatológios possuem características de pneumonia intersticial crônica, subcrônica ou difusa, com espessamento de septos intralveolares e infiltrados com linfócitos, macrófagos, plasmócitos, material fibrinoide eosinofílico (tipo favo de mel) ou material espumoso eosinofílico, onde se encontram imersas as estruturas fúngicas.
- **Cultura:** o *P. jirovecii* e as outras espécies de *Pneumocystes* não são cultiváveis em meios de cultura tradicionais. A propagação em laboratório do *Pneumocystis* só tem sido conseguida de forma transiente, por poucas semanas, em células epiteliais de pulmão e outras células alimentadoras (*feeder cells*). Em sistemas que não utilizam *feeder cells*, como os meios micológicos, o crescimento, efetivamente, não tem sido obtido.

Pneumocystis jirovecii (Frenkel, 1976). *Pneumocystis* spp. foram tradicionalmente considerados protozoários, tendo em vista sua morfologia e ciclo parasitários. Estudos moleculares, no entanto, demonstraram que esse organismo divide muitas de suas caracterísiticas com os fungos, tais como parede celular e estrutura enzimática. Uma diferença importante é a biossíntese de colesterol ao invés de ergosterol, que tipicamente caracteriza a membrana celular fúngica. Baseado na morfologia, seu ciclo de vida é dividido em dois estágios fundamentais: os trofozoítos, encontrados fora das formas císticas, e os cistos (ascos) esféricos ou semilunares, que contêm de 2 a 8 esporozoítos ou corpos intracísticos (ascósporos). Os trofozoítos ou formas tróficas livres representam o estágio assexuado do fungo. Nessa fase, a multiplicação ocorre por fissão binária ou endogenia, dando origem a novos trofozoítos. Por sua vez, os cistos (ascos) representam a fase sexuada do *P. jirovecii*, que acontece pela união dos citoplasmas (plasmogamia) e fusão dos núcleos (cariogamia) de dois trofozoítos sexualmente compatíveis. Em seguida, uma meiose e uma mitose têm lugar, formando, assim, os cistos (ascos) que irão conter os esporozoítos (ascósporos). Ao final do ciclo sexuado, os esporozoítos são, então, excistados para o tecido, trans-

formando-se em trofozoítos, que se ligam, consecutivamente, aos pneumócitos do epitélio do alvéolo pulmonar. A posição taxonômica desse fungo foi dada por estudos moleculares, o que permitiu a inclusão do *Pneumocystis* sp. no Filo Ascomycota, Subfilo Taphrinamycotina, Classe Pneumocystidomycetes, Ordem Pneumocystidales e Família Pneumocystidaceae.

- **Imunofluorescência indireta e outras provas sorológicas:** A imunofluorescência indireta com anticorpo monoclonal é uma técnica mais sensível do que aquelas de coloração histopatológica, sendo considerada um método padrão para o diagnóstico da pneumocistose. Uma vantagem da imunofluorescência indireta é a possibilidade de corar tanto cistos quanto trofozoítos, o que é especialmente importante, já que as formas tróficas são as mais abundantes na infecção pelo *P. jirovecii*. Além disso, é possivel excluir *Candida* sp. e *Histoplasma capsulatum* que podem gerar alguma confusão morfológica. O 1-3 β-D-glucano da parede celular dos fungos, utilizado para o diagnóstico de candidíase e aspergilose, tem sido também empregado para o diagnóstico de pneumocistose. Esse marcador sérico é particularmente útil no segmento do paciente, tendo em vista haver uma relação entre a diminuição dos níveis séricos do 1-3 β–-D-glucano e o sucesso da terapia com antimicrobianos. A detecção de lactato desidrogenase (LDH) e da mucina KL-6 (aumentadas) e do cofator enzimático s-adenosilcistina–SAM (diminuído) no soro de indivíduos com infecção, tem sido também proposto como marcador da doença.
- **Técnicas de PCR:** atualmente, a pesquisa de *P. jirovecii* por métodos moleculares, cujo fundamento é a amplificação de determinadas regiões do genoma do fungo, tem sido empregada. Nesse sentido, diferentes sequências genéticas do *P. jirovecii* (DHPS, DHFR, TS, β-tub, cdc2 gene, ITS, 5S rRNA, 18S rRNA, MSG, mtLSU rRNA, mtSSU rRNA) podem ser utilizadas como sítios-alvos específicos para o diagnóstico de pneumocistose, através da técnica de PCR e suas variações (Nested-PCR, Real-Time PCR, RT-PCR). A falta de padronização e a dificuldade de distinção entre colonização e infecção ou, ainda, entre infecção recente e antiga são, todavia, alguns dos problemas da metodologia molecular.

Diagnóstico diferencial

Os quadros pulmonares de pneumocitose devem ser diferenciados de tuberculose e outras infecções por micobactérias, citomegalovírus, criptococcose, histoplasmose e coccidioidomicose. As infecções óticas devem ser diferenciadas com bacterioses e viroses diversas e rinosporidiose. Nas doenças oftálmicas, deve ser distinguida de sarcoma de Kaposi e outros processos neoplásicos, e citomegalovírus.

Prognóstico e tratamento

A pneumonia por *P. jirovecii* tem prognóstico reservado a ruim, já que é potencialmente fatal, causando uma forte insuficiência respiratória, que pode levar ao óbito. Um tratamento efetivo pode ser instituído com sulfametoxazol-trimetoprima (SMX+TMP). Outras drogas empregadas são: atovoquina, clindamicina/primaquina, corticoides, pentamidina e, experimentalmente, as candinas. Terapia combinada também tem sido proposta. Derivados azólicos e poliênicos não devem ser utilizados pela ausência de ergosterol na membrana celular do gênero *Pneumocystis*.

PROTOTECOSE E CLORELIOSE

Prototecose

Etiologia e epidemiologia

A prototecose é uma infecção causada por algas do gênero *Prototheca* que, sob certas condições, acomete vertebrados, incluindo o homem e os animais superiores. Essas algas são unicelulares, imóveis, sem cloroplastos (aclorofiladas), com morfologia esférica, oval ou elipsoide, citoplasma basofílico granular e pequeno núcleo central. Em termos de tamanho, pode variar de 1,3-16,1 μm de diâmetro. Essas algas possuem parede celular hialina com aproximadamente 0,5 μm de espessura. As *Prototheca* spp. não apresentam em sua parede celular nem glicosamina, encontrada nos fungos, e nem ácido murâmico, observado em bactérias. Nutricionalmente, todas as *Prothoteca* utilizam sais de amônia ao invés de nitrato, assimilam álcoois (propanol) e açúcares como glicose, frutose, galactose, mas dissacarídeos não são metabolizados, e requerem tiamina e oxigênio para o seu crescimento. A posição taxonômica desses organismos tem sido discutida, mas, atualmente, considera-se que *Prototheca* sp., filogeneticamente é mais próxima às algas inferiores e aos vegetais do que aos fungos. Em termos de taxonomia, pertencem à Classe Trebouxiophyceae, Ordem Chlorellales e Família Chlorellaceae. No gênero *Prototheca* são reconhecidas 5 espécies válidas: *Prototheca wickerhamii, Prototheca zopfii, Prototheca stagnora, Prototheca ulmea* e *Prototheca blaschkeae* (termotolerante). As espécies envolvidas em doença humana e veterinária (cães, gatos, bovinos) são, principalmente, *P. zopfii* e *P. wickerhamii*. Diversos estudos fenotípicos sustentam a existência de distintos *clusters* de *Prototheca*, os quais têm sido nominados de variantes ou biotipos. Em *P. zopfii*, já foram identificados os biotipos I e II e parece existir, ainda, um outro biotipo, o biotipo III. *Prototheca* sp. têm reprodução assexuada por endosporulação (septação interna) e fissão binária com subsequente divisão citoplasmática para formação de endósporos. Em sua reprodução, a célula mãe (hialina) e não gemulante, denominada teca (endósporos imaturos) e esporângio (endósporos maduros), com tamanho de 3-30 μm, dá origem entre dois a vinte endósporos (autósporos ou esporangiosporos) que medem cerca de 9-11 μm. Esses endósporos permanecem dentro dos esporângios limitados por uma proeminente parede ou cápsula trilaminar de esporopolemina e, ao amadurecerem e aumentarem de tamanho em seu interior, por pressão, rompem os esporângios, sendo liberados passivamente para o meio externo, iniciando um novo ciclo biológico. Pouco

antes do rompimento, o agrupamento de endósporos dentro dos esporângios forma uma estrutura semelhante a uma "mórula". De acordo com o meio de cultura utilizado, o tempo de isolamento da *Prototheca* sp. pode variar entre dois a sete dias, em temperaturas de 25 ºC -37 ºC. Em ágar sangue ovino (ou bovino) desfibrinado a 5%, formam colônias pequenas, branco-acinzentadas. Em ágar Sabouraud dextrosado (SDA), as colônias formadas têm aspecto branco-dourado, com 1 a 2 μm de diâmetro. Após 72 a 96 horas de incubação, as colônias apresentam diâmetro entre 3 e 6 m e bordas irregularmente onduladas, com elevação central. As espécies de *Prototheca* são amplamente distribuídas na natureza, exibindo características cosmopolitas e ubiquitária. Esses organismos estão presentes em todos os continentes (menos Antártida), sendo mais prevalentes em regiões tropicais. Ambientes ricos em matéria orgânica e com alta umidade, como solos encharcados, áreas enlameadas e esgotos, oferecem condições ótimas para o desenvolvimento desse patógeno. O microrganismo tem sido também isolado de água do mar, lagos, rios e piscinas, água de serviço e potável, seiva de árvores, animais domésticos e selvagens, leite e outros alimentos (carnes, frutas e vegetais) e fezes. No entanto, as fontes mais importantes são, de fato, esgoto e dejeto animal. Esses organismos ainda colonizam transientemente os tecidos humanos como pele, unhas, trato respiratório e digestivo. A doença afeta indivíduos de qualquer etnia, sexo e idade, contudo, há um certo predomínio em indivíduos acima de 30 anos e idosos. Mais recentemente, têm sido informadas infecções em neonatos e crianças. Em termos de exposição ocupacional, trabalhadores em culturas de arroz, pescadores, peixeiros e fazendeiros são os mais susceptíveis. A prototecose podem ser uma infecção primária em indivíduos imunocompetentes ou oportunista em indivíduos com alterações em seu sistema imunológico. Além disso, pode ocorrer como uma infecção endógena, a partir de colonização no hospedeiro, ou exógena, a partir do ambiente. Os pacientes imunocomprometidos, todavia, são o principal grupo acometido. Como fatores predisponentes, têm sido relatado diabetes, neoplasias sólidas ou hematológicas, transplantes, corticoterapia, citostáticos, cirurgias (ortopédicas), alcoolismo e diálise peritoneal. Na doença animal, a mastite bovina é a enfermidade mais comum.

Clínica e patologia

A prototecose pode apresentar três formas clínicas básicas: cutânea e subcutânea, inflamação bursal e fascial, e disseminada ou sistêmica. A aquisição da infecção ocorre, geralmente, por contato de feridas e áreas traumatizadas do hospedeiro com água contaminada com os agentes etiológicos. A doença tem período de incubação de cerca de duas semanas, podendo ficar localizada ou se espalhar para outros tecidos e órgãos. Um importante fator crítico para o controle do desenvolvimento e espalhamento da infecção são os defeitos na função dos neutrófilos, os quais impactam negativamente a fagocitose, a degranulação celular e o metabolismo oxidativo, requeridos para a destruição do agente etiológico. A prototecose cutânea e subcutânea representa cerca de 70% das lesões por essas algas e pode ocorrer tanto em pacientes imunocompetentes quanto em imunocomprometidos, acometendo áreas expostas do hospedeiro como cabeça, face, pescoço, membros superiores e inferiores. O desenvolvimento das lesões normalmente é crônico e lento, e não há tendência a curas espontâneas. Os aspectos clínicos são variados e amplos, e compreendem pápulas, nódulos, abscessos, pústulas, placas eritematosas ou eritematoescamosas, verrugas, crostas e exsudação, hipopigmentação. Lesões atróficas e disseminação crônica com dor discreta podem ocorrer. Lesões vesiculobolhosas e ulcerativas, com descarga purulenta e prurido são, todavia, uma das apresentações mais frequentes. A prototecose pode ocorrer, geralmente, após implantação traumática ou pela utilização de cateter. Tem sido reportada, ainda, a ocorrência de lesões consecutivas a intervenções cirúrgicas e a tratamentos esclerosantes com instrumental contaminado. Essas lesões pós-operatórias se caracterizam pela presença de nódulos, sinovites e tenossinovites, com supuração crônica. Lesões subungueais (onicoprototecose) com paroníquia distal e descoloração amarelada têm sido relatadas. Outra forma clínica da prototecose são as lesões articulares que apresentam taxas de 15% a 50%. A maioria dos casos ocorre em pacientes imunocompetentes. A doença das articulações é representada, classicamente, pela bursite do cotovelo ou do olécrano. Essa lesão tem início como resultado da inoculação da *Prototheca* sp. na articulação radioumeral, por repetidos traumatismos ou por cirurgias ou, ainda, por disseminação de focos cutâneos. A maior parte dos casos cursa com aumento de volume da articulação, eritema, dor intensa, exsudato serosanguinolento e inflamação dos tecidos moles. A prototecose disseminada ou sistêmica é típica de pacientes profundamente imunocomprometidos e ocorre em percentuais de 5% a 20%. Os órgãos mais afetados são pele, tela subcutânea, baço, fígado, trato intestinal, urinário e respiratório, peritônio, linfonodos, coração, encéfalo e meninges. Diversos fatores susceptibilizam os pacientes, tais como neoplasias sólidas e hematológicas, Aids, transplantes de órgãos, corticoterapia, diálise, cateterismo e intubação endotraquial. Algemias, febres e calafrios podem ser observados em decorrência do uso de cateter venoso central. Apesar de estar mais frequentemente associada a pacientes hospitalizados, têm sido relatados alguns casos de doença sistêmica, em indivíduos imunocompetentes.

Diagnóstico laboratorial

- **Exame direto e histopatologia:** no exame micológico direto com KOH 10%, podem ser observadas numerosas células (3 a 30 μm) arredondadas, ovoides ou elípticas, com parede celular espessa (esporângios) e várias septações internas que dão origem a cerca de 2 a 20 endósporos (9 a 11 μm) delgados dispostos radialmente, formando uma estrutura multisseptada denominada mórula. Essas estruturas podem ser confundidas com esférulas de *Coccidioides immitis*/*Coccidioides posadasii* e *Rhinosporidium seeberi,* células de levedura de

Paracoccidioides brasiliensis, *Histoplasma duboisii, Blastomyces dermatitides, Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* e corpúsculos muriformes. Os estudos microscópicos podem ser procedidos com o emprego de colorações como branco de calcoflúor, ácido periódico de Schiff (PAS) e Gomori-Grocott (prata).

- **Cultura:** *Prototheca* sp. crescem prontamente na maioria dos meios de cultura usados na rotina. Em ágar Sabouraud dextrosado sem ciclo-heximida, as algas formam colônias brancas, cremes ou beges, lisas e com aspecto leveduriforme, visíveis em 24-72 horas de incubação, à temperatura de 25 °C -37 °C. Temperaturas acima de 40 °C, cicloheximida e antifúngicos azólicos e poliênicos inibem o crescimento desses organismos em cultura. Todavia, cloranfenicol, penicilina e estreptomicina não afetam seu desenvolvimento *in vitro*.

Dentre as espécies conhecidas, duas delas têm maior importância clínica, a *P. wickerhamii,* com de 80% dos casos, e a *P. zopfii,* com 18%. Os outros 2% são distribuídos para as três espécies restantes (*P. stagnora*, *P. ulmea*, *P. blaschkeae*). Para a identificação das espécies de *Prototheca* são avaliadas tanto as características morfológicas quanto fisiológicas. Como as colônias de *Prototheca* são semelhantes às de *Candida* spp., a distinção entre os dois organismos deve ser procedida acrescentando ao meio de cultura um algaecida como a ribostamicina, à concentração de 60 μg, pois essa substância inibe o crescimento da alga, mas não afeta a levedura. Morfologicamente, *P. wickerhamii* exibe colônias de aspecto cremoso, coloração esbranquiçada com margens lisas, que tendem a tornar-se amareladas com o tempo. Os esporângios medem de 3-15 μm, seus endósporos são arredondados e medem de 4-5 μm, estão dispostos simetricamente como uma flor e, a partir de seguidas divisões, podem alcançar um número de 50 endósporos. Em termos de estudos bioquímicos, *P. wickerhamii* assimila glicose, galactose, trealose, mas não assimila sacarose e nem propanol. Essa alga cresce bem à temperatura de 37 °C. Relativamente à *P. zopfii*, a morfologia cultural mostra um aspecto cremoso, esbranquiçado, enrugado, áspero e com uma margem ondulada. Os esporângios medem em torno de 7-30 μm, contêm endósporos com diâmetros que variam de 9-11 μm e não mostram disposição simétrica. Bioquimicamente, assimila glicose e propanol, mas não assimila galactose, sacarose e trealose. Não há restrições quanto ao crescimento à 37 °C.

Diagnóstico diferencial

A prototecose cutânea deve ser diferenciada de eczema, *herpes simplex*, dermatite por contato, t*í*neas e onicomicoses. A doença subcutânea dever ser separada de cromoblastomicose, esporotricose, coccidioidomicose, leishmaniose, tuberculose, linfomas cutâneos. A bursite deve ser distinguida daquelas causadas por bactérias. As formas disseminadas devem ser diferenciadas de micoses endêmicas como a esporotricose, coccidioidomicose e histoplasmose, e calazar.

Prognóstico e tratamento

O prognóstico é reservado a ruim, dependendo da condição imunológica dos pacientes. Não há um tratamento específico, todavia, têm sido empregados antibióticos, tais como gentamicina, tetraciclina, polimixina B, amicacina e pentamidina, e antifúngicos, incluindo o cetoconazol, fluconazol. itraconazol, posaconazol, voriconazol, griseofulvina, nistatina, anfotericina B tradicional, lipossomal e lipídica, candinas e iodeto de potássio. Além disso, cirurgias, bursectomias, retirada de cateter infectado e termoterapia podem ser procedidas.

Cloreliose

A alga do gênero *Clorella,* um organismo muito proximamente relacionado ***à*** *Prototheca* sp., tem sido relatada como patógeno ocasional em vertebrados, acometendo animais domésticos e selvagens, e os seres humanos. *Clorella* sp. é uma alga verde que contém clorofila, um pigmento fotossintetizante. Essa alga é ubiquitária, sendo isolada de diversas fontes ambientais. Em termos gerais, a morfologia de *Clorella* sp. e de *Prototheca* sp. demonstra grande similaridade de forma, tamanho e parede celular. *Clorella* sp. apresenta uma parede celular bem definida e fortemente associada à membrana citoplasmática. Essas algas podem apresentar, ainda, um simples núcleo, ser binucleadas ou mesmo trinucleada. Diferentemente de *Prototheca* sp., no entanto, *Clorella* sp. apresenta um único cloroplasto de grandes dimensões, além de numerosos grânulos de amido em seu citoplasma. O ciclo vital é, igualmente, bastante semelhante ao da *Prototheca* sp., produzindo um esporângio hialino e refrátil (7 a 25 μm) que, quando maduro, formam assexuadamente de 2 a 20 endósporos (2 a 6 μm). Estruturas tipo mórula também podem ser encontradas. Após sua endoesporulação (septação interna), há ruptura, por pressão, da parede do esporângio e liberação dos endósporos, que iniciam um novo ciclo. *Clorella* sp. é considerada um patógeno oportunista, agente de doença localizada ou disseminada que, para a ocorrência de infecções, necessita de certo grau de imunocomprometimento dos hospedeiros, inoculação traumática, contaminação de feridas (inclusive feridas cirúrgicas) e pesada exposição ambiental. Micoses endêmicas crônicas, que levam à debilidade orgânica dos hospedeiros, parecem ser um fator predisponente específico. O comprometimento de pele, linfonodos e trato gastrointestinal, nefrite intersticial, asma e alergia têm sido relatados. Em lesões de órgãos e tecidos que exibam coloração esverdeada, a cloreliose deve ser considerada. O contágio pode ocorrer por ingestão ou contato com águas estagnadas com forte contaminação por essas algas. O organismo cresce em meios micológicos usuais, produzindo também colônias verdes. *Clorella* sp. pode ser diferenciada de *Prototheca* sp. por métodos citoquímicos ou ultraestruturais. Os achados de cloroplastos e grânulos na microscopia eletrônica suportam o diagnóstico de *Clorella* sp. Preparações a fresco e por Giemsa permitem a visualização dos grânulos com pigmentos verdes. A parede celular e os grânulos se coram, ainda, pelo Gram, hematoxilina & eosina (HE) e por Gromori-Grocott (prata). Da mesma forma, em

colorações pelo ácido periódico de Schiff (PAS), a parede celular e os grânulos também aparecem positivos. A perda do pigmento esverdeado, todavia, pode ocorrer em preparações histopatológicas, por dissolução. O tratamento poder requerer cirurgia e quimioterapia antifúngica (anfotericina B) combinada com antibióticos (tetraciclina).

RINOSPORIDIOSE

Etiologia e epidemiologia

A rinosporidiose é uma infecção granulomatosa de evolução crônica que acomete o tecido mucocutâneo, formando massas tumorais. O agente etiológico dessa condição é o *Rhinosporidium seeberi,* um protista da classe Mesomycetozoea, ordem Dermocystida, que é parasita de animais e seres humanos. Esse organismo não tem sido isolado em cultura, e nos tecidos, se apresenta como esférulas de paredes espessas, contendo endósporos. Infecções experimentais também não têm sido reproduzidas em modelo animal. Em decorrência do não crescimento em meios artificiais ou propagação em laboratório, o *habitat* natural de *R. seeberi* ainda se mantém algo desconhecido, à semelhança de *Lacazia loboi*. No entanto, evidências ecoepidemiológicas apontam para ambientes aquáticos como rios, lagos, piscinas e banhos públicos, e outras coleções de água represada ou estagnada. A doença ocorre em todos os continentes, todavia, é mais comum nos trópicos, tendo sua maior prevalência no sudeste da Índia e Siri Lanka. Importantes casos, contudo, têm sido também relatados na América do Sul. Os indivíduos do sexo masculino compõem a principal população de pacientes, porém, aqueles do sexo feminino têm se mostrado mais sensíveis à infecção ocular. Apesar da média de idade dos pacientes com rinosporidiose estar entre 20 e 40 anos, uma ampla faixa etária poder ser acometida. Em crianças muito jovens, no entanto, os relatos de doença pelo *R. seeberi* são pouco frequentes. Geralmente as pessoas de áreas rurais ou que vivem e/ou trabalham em regiões "ribeirinhas" ou lacustres estão mais propensas à aquisição da infecção. Casos de infecções oculares têm sido relatados em áreas desérticas, provavelmente em decorrência de areia e água de poços ou oásis contaminados. Tempestades de areia parecem ser também um fator crítico.

Clínica e patologia

Em áreas de solução de continuidade dos tecidos e após o contato com água ou poeira contaminadas, lesões caracterizadas pela presença de pólipos lobulados ou papilados, vascularizados, rosáceos ou avermelhados, macios, friáveis e com base peduncular ou séssil podem se desenvolver. Hiperqueratose, hiperplasia pseudoepiteliomatosa e erosão, além de edemas e hemorragias, podem ser observadas na região das lesões. Histologicamente, esses pólipos apresentam um infiltrado celular composto por neutrófilos, histiócitos, eosinófilos, células gigantes, linfócitos e células plasmáticas, bem como esférulas em diferentes estágios e endósporos. Em geral, os sítios anatômicos mais afetados são a mucosa nasal (>70%) e a conjuntival (16%), todavia, esporadicamente, processos profundos e generalizados podem ocorrer.

A doença nasal é assintomática até que a obstrução da passagem do ar ou sensação de corpo estranho na mucosa comecem a ser percebidos, em decorrência do aumento do tamanho do pólipo. Esse crescimento é, normalmente, unilateral, e pode se dar no sentido da orofaringe, ocluindo faringe e laringe, e causando disfagia, disfonia ou dispneia; ou no sentido das narinas, produzindo uma massa tumoral que se projeta para fora do conduto nasal, se estendendo até a região labial. Pontos esbranquiçados, contendo grande quantidade de parasitas, podem ser observados macroscopicamente sobre a superfície desses pólipos. Prurido e coriza são queixas frequentes, contudo, não é comum o relato de dor. As descargas nasais podem se apresentar francamente mucoides e sanguinolentas, e também conter elevado número de endósporos e esférulas do *R. seeberi*. Hemorragias e epistaxes graves podem também estar presentes. A drenagem de secreção para a nasofaringe pode desencadear episódios de tosse. Importantes complicações são as sinusites bacterianas, que cursam com sensibilidade e secreção mucopurulenta, e estão associadas às obstruções nasais.

As infecções oculares são mais frequentes em regiões secas ou de baixa precipitação pluviométrica e parecem estar relacionadas com tempestades de areia. A maioria das lesões é unilateral e acomete a conjuntiva palpebral. Todavia, bulbo ocular, limbo corneano, canto interno do olho, carúncula e vias lacrimais podem ser também afetados. De maneira muito ocasional, palato, língua, úvula, amigdalas, epiglote, laringe, traqueia e seios paranasais podem ser envolvidos. Essas lesões são de tamanho reduzido e acomodadas na estrutura ocular, por isso, o processo é normalmente assintomático, não produzindo mal-estar ou dificultando a visão. Os principais sintomas, contudo, são sensação de corpo estranho, fotofobia, lacrimejamento, descarga sanguinolenta, edema e eritema ocular. A oclusão do canal lacrimal pode levar à formação de massas subcutâneas.

O comprometimento do tecido cutâneo não adjacente às lesões mucosas é raro e, na maioria das vezes, ocorre por autoinoculação. Da mesma forma, lesões primárias da pele são de frequência extremamente baixa. Como nas lesões de mucosa, os processos cutâneos também apresentam uma natureza poliposa e a ausência de sintomas. Normalmente, essas lesões são únicas ou solitárias, mas o surgimento em múltiplos sítios tegumentares parece ser consequência de disseminações hematogênicas. Pacientes com processos mucocutâneos disseminados podem apresentar, igualmente, comprometimento de órgãos internos como pulmão, baço, fígado, rins e tecido ósseo. Nesses casos, febre, enfraquecimento e morte podem ocorrer. Outras áreas afetadas são trato geniturinário, mucosa anal, glândulas parótidas, cérebro e conduto auditivo externo.

Diagnóstico laboratorial

- **Exame microscópico direto e histopatologia:** tendo em vista que o *R. seeberi* é um patógeno não cultivável, os únicos elementos de diagnóstico são a

microscopia direta ou o estudo histopatológico dos pólipos. Entretanto, em decorrência do tamanho de suas estruturas vegetativas, esse parasita pode ser também visualizado, clinicamente, como pontos brancos sobre as lesões poliposas. No laboratório, o exame microscópico das preparações a fresco, tratadas com KOH a 10% a 20%, permite a observação de esférulas com ostíolos em várias fases de desenvolvimento, com dimensões de até 350 μm e grande quantidade de endósporos (5-10 μm). O emprego de técnicas histopatológicas como hematoxilina e eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS), Gromori-Grocott (prata), Gridley e mucicarmin de Meyer revela uma morfologia semelhante à observada em exame direto. As esférulas de *R. seeberi* devem ser diferenciadas daquelas de *Coccidioides immitis*/*Coccidoides posadasii, Emmonsia crescens* e *Emmonsia parva*.

Rhinosporidium seeberi (Wenicke) (Seeber, 1912)

- ***Taxonomia:*** o *R. seeberi* é um protista da Classe Mesomycetozoea e Ordem Dermocystida, que congrega organismos aquáticos (*Dermocystidium* sp., *Sphaerothecum destruens, Ichthyophonus* sp. e *Psoropermium* sp.), agentes de infecções similares em peixes e anfíbios, e que filogeneticamente estão na fronteira entre animais e fungos.
- ***In vivo:*** a infecção tem origem (fase trófica), quando o esporo infectante (trofócito) penetra no epitélio da mucosa e inicia seu desenvolvimento. Nesse estágio, o esporo infectante mede 5-10 μm e apresenta um citoplasma claro com núcleo vesicular. Ao atingir 10 a 15 μm, surge um material lipídico de aspecto globular e granular no citoplasma. A primeira divisão nuclear ocorre quando o esporo-esférula chega a 50 μm. Em seguida, sucessivas divisões nucleares ocorrem, formando uma grande quantidade de núcleos. Ao alcançar a marca de 2.000 núcleos, o citoplasma começa a clivar-se em torno desse material nuclear da periferia para o centro. A esférula nessa fase mede cerca de 100 a 350 μm. As esférulas maduras contêm entre 16.000 e 20.000 endósporos que medem 7-9 μm. A liberação desses esporos endógenos para o tecido exterior ocorre através de um ostíolo na parede da esférula.

Diagnóstico diferencial

As lesões poliposas da rinosporidiose devem ser diferenciadas de condiloma na região genital, prolapso hemorroidal, hemangiomas e neoplasias. O exame microscópico direto e a histopatologia do material clínico permitem a realização do diagnóstico diferencial, com alto grau de confiabilidade.

Diagnóstico e tratamento

A doença tem bom prognóstico, visto que é de curso insidioso e, normalmente, se mantém localizada, não produzindo debilidade física e nem impedindo o exercício da atividade profissional. Curas espontâneas são de rara ocorrência e o tratamento inclui excisão cirúrgica, eletrocauterização e quimioterapia antifúngica. Todavia, recaídas são uma característica da infecção.

TINEA NIGRA

Etiologia e epidemiologia

A *tinea nigra* é uma dermatomicose marcada pela presença de manchas assintomáticas de aspecto arredondado, bordas bem definidas e hiperpigmentadas que se localizam, preferencialmente, na região palmar e/ou plantar. O fungo *Hortaea werneckii* (*Phaeoannellomyces werneckii*, *Exophiala werneckii*) é o agente etiológico desse processo. Caracteristicamente, *H. werneckii* apresenta grande variabilidade morfológica, contendo elementos leveduriformes e miceliais de coloração demácea, bem como reprodução por gêmulas e conídios. A morfologia tecidual tem se mostrado, igualmente, polimórfica com células de levedura, blastósporos e hifas septadas e ramificadas. Na natureza, esse fungo é encontrado no solo e em associação com matéria orgânica em decomposição e, nos tecidos, utiliza os lipídios livres existentes na camada córnea e é favorecido pela alcalinidade do pH e altos teores de sal. *Tinea nigra* é frequente em regiões tropicais, ocorrendo, principalmente, na América Latina, África e Ásia. Nas áreas temperadas, há casos reportados na América do Norte e Europa. A doença é mais prevalente em indivíduos com idade inferior a 20 anos e o sexo feminino é três vezes mais acometido. Fatores predisponentes ou de risco não têm sido descritos, mas a maior concentração de glândulas sudoríparas e hiperidrose parecem facilitar o surgimento da doença, em certas regiões da epiderme.

Clínica e patologia

A *tinea nigra* é definida como máculas ovaladas, pardacentas, simples ou confluentes e indolores, que surgem na região da palma da mão e/ou planta dos pés de indivíduos hígidos, após implantação traumática do agente etiológico com material de origem vegetal. O período de incubação dura, em média, uma semana, mas há relatos na literatura de até duas décadas. Em geral, as lesões apresentam um diâmetro de cerca de 5 cm, margens irregularmente delimitadas e coloração que varia de marrom a negro. O acúmulo de melanina fúngica nas áreas afetadas parece determinar a hiperpigmentação cutânea. Outros aspectos clínicos como elevações, descamação, eritrema e adenopatias regionais não são observados, todavia, pode estar presente prurido. As alterações histológicas são extremamente superficiais, não atingindo áreas mais profundas do estrato córneo, e seu aspecto mais evidente é uma leve hiperqueratose. De maneira ocasional, a doença pode atingir os dedos das mãos ou dos pés, punhos, tronco, pescoço e unhas.

Diagnóstico laboratorial

- **Exame microscópico direto e histopatologia:** o diagnóstico pode ser procedido com uma simples visualização microscópica das escamas de pele. A partir do exame micromorfológico com KOH a 10% a 20%, é

possível observar hifas negras, intensamente septadas, ramificadas, tortuosas e de paredes espessas, medindo cerca de 5 µm de diâmetro. Hifas fragmentadas, clamidósporos, células gemulantes, com ou sem septos, e medindo cerca de 1,5-5 µm de diâmetro podem ser também visualizadas nos tecidos.

- **Cultura:** A *H. werneckii* pode ser isolada em meios de culturas usualmente empregados no laboratório de micologia como o ágar Sabouraud dextrosado com ou sem antimicrobianos (cloranfenicol e cicloheximida), ágar batata dextrosado (BDA) ou ágar extrato de malte. As escamas de pele são inoculadas no meio de cultura e incubadas à temperatura de 25 °C -30 °C, por até 4 semanas. Em geral, o fungo apresenta um crescimento lento (1 a 3 semanas).

Hortaea werneckii (Horta) (Nishimura et Miyaji, 1984)

- **Morfologia macroscópica:** a *H. werneckii* cresce lentamente, atingindo um diâmetro de 0,9-1,5 µm em 1 a 2 semanas. A colônia surge, primeiramente, com um crescimento leveduriforme, úmido, brilhante e de coloração branco "sujo" a cinza, entretanto, rapidamente passa a negro, negro-esverdeado ou oliva-escuro. Algumas vezes, as colônias leveduriformes negras produzem um brilho metálico. Com o tempo, a cultura se torna, pelo crescimento de um micélio aéreo acinzentado na periferia da colônia, menos úmida e mais filamentosa, e o centro oliva perde seu brilho e apresenta uma fina camada de micélio. Nos isolados estéreis ou pobremente esporulantes, as colônias são também cobertas com um espesso micélio aéreo cinza-esverdeado a cinza-escuro, que dá uma aparência flocosa. O reverso é negro.
- **Morfologia microscópica:** inicialmente, a colônia é composta por células de levedura, sendo algumas septadas centralmente (bicelulares). Essas células são fusiformes ou cilíndricas, afiladas em sua extremidade com polos em anéis, medindo entre 3-10 µm de diâmetro e formadas nas laterais ou nas extremidades das hifas. Em seus polos anelídicos, produzem células por conidiogênese. Com o tempo, as colônias desenvolvem micélio alongado tortuoso com numerosas septações. As hifas tornam-se pigmentadas e formam cachos ou rácimos de conídios, a partir de células conidiogênicas indiferenciadas (apículos), pequenas e intercalares (1-2 × 1-4 µm) ou a partir de conidióforos de 20 a 30 µm de comprimento. Nesta fase, o micélio pode ser espesso, medindo até 7 µm de diâmetro, com células retangulares em cadeia. Os conídios são numerosos, septados ou não, desenvolvem-se em qualquer ponto do micélio, são hialinos, quando jovens, tornando-se, posteriormente, marrom claro ou oliva; apresentam paredes lisas e têm forma elipsoide ou oval, e podem medir 5 a 9,5 × 2,4 a 5 µm, quando unicelulares, e 7-10 × 3,5-4,5 µm, quando bicelulares. Os esporos podem se arranjar como cachos ao longo da hifa, simulando a aparência de cachos de blastósporos ao longo das pseudohifas de *Candida* sp. As colônias mais antigas produzem tufos de micélio cinza-esverdeado. Algumas vezes, clamidósporos com uma parede escura e espessa se desenvolvem na colônia. Tais estruturas são singulares e têm uma ou mais septações. Com a idade, a formação de cachos de esporos pode ser semelhante àquela observada em *Aureobasidium pullulans*.

Diagnóstico diferencial

Os processos que apresentam hiperpigmentação cutânea como nevos e melanoma devem ser cuidadosamente diferenciados. Hiperpigmentações pós-inflamatória, sifilítica e por doença de Addison, bem como aquelas decorrentes de substâncias químicas, devem ser também consideradas.

Prognóstico e tratamento

O prognóstico é bom, já que essa afecção não coloca em risco a vida do paciente. A *tinea nigra* responde bem ao ácido salicílico, agentes queratinolíticos, enxofre, selênio, tintura de iodo, ciclopiroxolamina, derivados azólicos de uso tópico e sistêmico (bifonazol, cetoconazol, clotrimazol, itraconazol) e terninafina. Não responde bem à griseofulvina oral, tolnaftato tópico e poliênicos tópicos.

ZIGOMICOSE (MUCORMICOSE, MUCOROMICOSE OU MUCORALOMICOSE E ENTOMOFTOROMICOSE)

Etiologia e epidemiologia

Zigomicose é uma infecção causada por fungos ubiquitários frequentemente encontrados no solo e em associação com plantas, insetos e animais. Os agentes dessa condição pertencem ao Filo Zygomycota, Classe Zygomycetes e Ordens Mucorales e Entomophthorales. Claramente, etiologia, ecoepidemiologia e aspectos anatomoclínicos diferem dentro dessas duas ordens. Os fungos da ordem Mucorales são de distribuição mundial e, normalmente, se desenvolvem sobre material orgânico em decomposição. A morfologia em vida livre é caracterizada pela presença de hifas asseptadas e ramificadas, esporangiósporos formados dentro de esporângios e zigósporos como esporos sexuais. Nos tecidos, podem ser visualizados como hifas asseptadas e ramificadas em ângulo reto. Membros da ordem Mucorales como *Cunninghamella* sp., *Lichtheimia* sp. (*Absidia* sp.), *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Rhizomucor* sp. e *Syncephalastrum* sp. causam uma zigomicose de natureza oportunista denominada, especificamente, mucormicose, mucormicose ou mucoralomicose. Essa infecção é mais prevalente em pacientes imunocomprometidos, sendo pouco comum em hospedeiros que não apresentam alterações de seus mecanismos de defesa. O espectro de manifestações clínicas inclui uma forma cutânea, rino-órbito-cerebral e disseminada com agressiva angioinvasão. Os fatores predisponentes são decorrentes de imunossupressão, alterações me-

tabólicas e nutricionais e ruptura da barreira cutaneomucosa. As espécies da Ordem Entomophthorales (*Basidiobolus ranarum* e *Conidiobolus coronatus*) são também fungos telúricos e estão relacionados à matéria orgânica morta, bem como ao trato gastrointestinal de peixes, anfíbios, répteis, morcegos e alguns artrópodes. Em termos de distribuição, esses organismos são amplamente encontrados na natureza, todavia, são mais prevalentes em florestas úmidas de regiões tropicais e subtropicais. Os Entomophthorales se apresentam em fase sapróbia como hifas asseptadas ou esparsamente septadas, balistósporos e zigósporos. Na fase parasitária, podem ser observadas pequenas hifas asseptadas ou com septados esparsos, raras ramificações e bainha eosinofílica (fenômeno de Splendore-Hoeppli). Diferentemente dos agentes da Ordem Mucorales, esses patógenos acometem pacientes infantis ou adolescentes imunocompetentes e, de forma ocasional, indivíduos adultos. A zigomicose determinada por membros da Ordem Entomophthorales é designada de entomoftoromicose. Dependendo da espécie envolvida, a infecção pode ser, ainda, chamada de basidiobolomicose (*B. ranarum*) ou conidiobolomicose (*C. coronatus*). Clinicamente, a basidiobolomicose é caracterizada pela formação de massas subcutâneas em ombros, membros e nádegas, enquanto a conidiobolomicose produz massas submucosas crônicas na região nasal.

Clínica e patologia

A infecção por membros da ordem Mucorales em pacientes imunocomprometidos pode ter início por uma via respiratória, através da inalação de elementos fúngicos em suspensão no ar, ou por uma rota cutânea ou percutânea, pela implantação traumática do fungo com agulhas, sondas, cateteres e bandagens, bem como queimaduras e feridas cirúrgicas. A ingestão de alimentos e bebidas e medicações naturais à base de produtos vegetais ou homeopáticos contaminados pode determinar infecções, através de uma rota gastrointestinal. A susceptibilidade dos hospedeiros à mucormicose ocorre por falhas na quimiotaxia, na eliminação e supressão da germinação dos esporos e na capacidade de destruição dos elementos hifálicos. Em geral, essas ações protetoras são desempenhadas, primariamente, pelos monócitos/macrófagos que, ao fagocitar e eliminar os propágulos por um mecanismo oxidativo intracelular, previne a germinação, a formação de hifas e o estabelecimento de infecção. Por sua vez, os neutrófilos destroem as estruturas hifálicas, impedindo a invasão vascular e morte dos tecidos. Diferentes patologias de base e fatores de risco interferem diretamente com a atividade dessas células. Tumores sólidos e hematológicos e seus tratamentos, e transplantes de órgão e de medula óssea são importantes fatores que levam à diminuição do número de neutrófilos e linfócitos, favorecendo a infecção por Mucorales. O *diabetes mellitus* descompensado em cetoacidose é crítico para o desenvolvimento da mucormicose nos pacientes, pois, em pH baixo, a quimiotaxia, a fagocitose e o sistema oxidativo são comprometidos, o que determina uma neutropenia funcional. Somado a isso, a transferrina em pH ácido apresenta alterações de suas funções, não se complexando ou sequestrando o ferro sérico, que fica disponível para o crescimento fúngico. Da mesma forma, a terapia com deferoxamina, empregada para quelar o alumínio e o ferro de pacientes com falha renal crônica, predispõe à doença, porque os Mucorales são capazes de utilizar o ferro ligado à droga para a replicação tecidual. A supressão da resposta inflamatória e a indução de acidose pela terapia com corticoides também determinam a susceptibilidade dos hospedeiros a esses fungos. Igualmente, o uso prolongado de antibióticos de largo-espectro pode causar a destruição da microbiota e permitir o estabelecimento de uma infecção fúngica sem a barreira da competição bacteriana.

Clinicamente, os processos determinados por membros da Ordem Mucorales incluem a mucormicose rino-órbito-cerebral (craniofacial ou sinusite), pulmonar, cutânea, gastrointestinal e disseminada. A forma rino-órbito-cerebral é a principal condição da doença, ocorrendo em pacientes com acidose em quase 50% dos casos. A infecção tem início após a inalação de esporos fúngicos e implantação na mucosa paranasal. Normalmente, é de evolução rápida, com comprometimento progressivo de órgãos e tecidos adjacentes como nariz, olhos e cérebro. Sintomas de sinusite aguda com sensibilidade e dor retro-ocular, congestão, rinorreia purulenta ou serosanguinolenta, epistaxe, febre e mal-estar são, inicialmente, observados. Os seios etmoidal e maxilar são infectados com frequência. A pele da região lesionada se mostra edemaciada, eritematosa e enegrecida pela necrose decorrente da angioinvasão e trombose. Esse processo se estende à face, região periorbital, infraorbital e orbital, produzindo também intensa tumefação e necrose. Proptose, ptose, quemose, edema de pálpebra, insensibilidade periorbital, diplopia, oftalmoplegia, ausência de resposta pupilar e queda ou perda da capacidade visual podem ser observados quando o globo ocular, estruturas retrobulbares e nervo cranial são envolvidos. Ao ser afetada, a cavidade oral pode apresentar dor, necrose e úlceras no palato duro. O acometimento cerebral ocorre por progressão no nervo óptico e/ou invasão e destruição dos ossos turbinados e, em consequência, uma descarga nasal sanguinolenta pode estar presente. Comumente, as meningoencefalites determinam áreas de anestesia e paralisia, alterações neurológicas e mentais e coma. A infecção pulmonar pode ser estabelecida após a inalação de elementos fúngicos ambientais, aspiração de material contaminado ou ser secundária à mucormicose rinocerebral ou disseminada. Febre persistente à antibioticoterapia de amplo espectro e rápida progressão clínica são características. Esse processo compromete com maior frequência pacientes profundamente neutropênicos, como aqueles com leucemias e linfomas e submetidos a transplantes de medula óssea ou à prolongada corticoterapia. Nódulos solitários, infiltrados intersticiais, consolidação lobular e segmentar, e lesões cavitárias podem ser encontrados. Enfartos, tromboses e extensa necrose, e hemorragias decorrentes da invasão de vasos pulmonares são achados comuns. Lesões de traqueia e zigomicose endobronquial crônica podem estar presentes. O espalhamento por contiguidade ou hematogênico e linfático pode afetar outras áreas torácicas e

extrapulmonares como diafragma, pericárdio, miocárdio, veia cava superior e encéfalo. Hemoptises fatais associadas à erosão e invasão de artérias pulmonar e aórtica têm sido relatadas. A radiografia pulmonar é inespecífica. A mucormicose cutânea é de particular importância em pacientes diabéticos e queimados. A doença tegumentar pode ocorrer por implantação mecânica de esporos fúngicos, através de agulhas e outros materiais perfurocortantes e esparadrapos e bandagens contaminados, por deposição de esporos em suspensão no ar ou, ainda, por disseminação vascular. A forma mais comum é a infecção primária de lesões preexistentes produzidas por ferida cirúrgica, diabetes ou queimaduras. Essas lesões se apresentam extremamente inflamadas, supuradas, endurecidas, abcedadas, necróticas e hemorrágicas. Úlceras extensas podem ser formadas pela retirada do tecido necrótico superficial. As lesões primárias podem ser, ainda, localmente muito invasivas, acometendo tecido subcutâneo, tecido adiposo, músculos, fáscias (fasciíte necrosante) e ossos. A angioinvasão pode determinar o espalhamento a sítios alhures. As lesões cutâneas secundárias à disseminação hematogênica são caracterizadas por nódulos subcutâneos com mínima destruição da epiderme e eventual ulceração. A mucormicose gastrointestinal é pouco frequente, mas todo o trato digestivo pode ser acometido. Mucosa, submucosa e vasos sanguíneos são invadidos, produzindo úlceras necróticas, perfuração das mucosas e peritonites. Dor, febre, náusea, vômitos, hematêmese, diarreia, hematoquesia são os sintomas observados. Essa condição comumente é fatal e a subnutrição infantil parece ser um importante fator de risco. Outra síndrome relacionada à mucormicose gastrointestinal é decorrente da colonização superficial fúngica de lesões ulceradas, que se apresentam com uma textura velutina e um centro necrótico de coloração esverdeada a negra. Tipicamente, não há invasão e destruição da mucosa e a taxa de sobrevivência é elevada. A mucormicose disseminada ocorre pelo espalhamento hematogênico ou linfático do fungo, a partir de infecção pulmonar ou inoculação iatrogênica na corrente sanguínea. Menos frequentemente, a mucormicose rinocerebral e cutânea são fontes de doença disseminada. Essa forma apresenta manifestações clínicas múltiplas, dependendo dos órgãos acometidos e da intensidade lesional. Taxas de mortalidade extremamente elevadas (96% a 100%), associadas à profunda e prolongada neutropenia e à terapia com deferoxamina, têm sido descritas.

A entomoftoromicose compreende dois processos patológicos (basidiobolomicose e conidiobilomicose) com clínica e etiologia distintas, mas semelhantes em suas histologias. A basidiobolomicose pode se desenvolver a partir de traumatismos, mordeduras de insetos, contato com solo e material vegetal contaminados ou, ainda, de maneira iatrogênica. A rara forma rinocerebral observada em hospedeiros hiperglicêmicos parece estar relacionada à inalação de esporos do *B. ranarum*. Normalmente, a doença acomete indivíduos imunocompetentes e tem como sítios mais frequentes ombros, membros, tronco, nádegas e região inguinal e perineal. A infecção se caracteriza por apresentar lesões subcutâneas crônicas com formação de nódulos inflamados, endurecidos e dolorosos, aderidos à pele, mas não ao tecido subjacente, que, ocasionalmente, podem ulcerar. Essas lesões nodulares são de evolução lenta e espalhamento local. Compressão linfática e linfoedemas podem estar presentes. A doença gastrointestinal é de ocorrência pouco comum e acomete pacientes saudáveis e diabéticos. As porções do trato gastrointestinal mais comprometidas são o estômago, duodeno e cólon, além de pâncreas, fígado e vias biliares. Infiltração granulomatosa e fibrose da *muscularis propria* sem invasão vascular são típicas. Clinicamente, observa-se dor abdominal, diarreia, constipação, perda de peso, febre e calafrios. A morte pode ser decorrente de obstrução. Basidobolomicoses invasivas, com infecção de seios maxilares e intensa destruição de palato duro e angioinvasão, infecção retroperitoneal e envolvimento muscular e de linfonodos têm também sido relatadas. A conidiobolomicose rinofacial pode ser desencadeada pela inalação de esporos do fungo que se implantam na mucosa nasal ou a partir de pequenos traumatismos como aqueles produzidos pela mordedura de insetos. A infecção acomete mais frequentemente pacientes em boas condições de saúde. A principal manifestação clínica é a sinusite crônica que se inicia como uma tumefação na região dos ossos turbinados e se estende às áreas contíguas. O espalhamento envolve o tecido subcutâneo da face, linfonodos e seios paranasais. Usualmente, as lesões nodulares formadas são firmes e aderidas às estruturas subjacentes. Apesar de se manter intacta, a pele sobre os nódulos se torna brilhante e avermelhada. Sobrancelhas, pálpebras e parte superior dos lábios podem estar desfigurados. Como resultado do edema e do intumescimento que se estabelecem na região facial e nasal, sensibilidade dolorosa, obstrução, rinorreia e espistaxe são observados. Comprometimento de faringe e laringe, com extenso e crônico linfoedema, pode ocorrer. Diferentemente da mucormicose rino-órbito-cerebral, meningoencefalites não têm sido descritas. O espalhamento a focos distantes não é comum, mas há relatos de angioinvasão e doença disseminada fatal.

Uma infecção invasiva de origem pulmonar pode ser causada por *Conidiobolusincongruus*. A doença afeta indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos e pode ser fatal, independentemente da condição imunológica dos pacientes. Pulmão e mediastino, pericárdio e endocárdio, tecido cutâneo e subcutâneo, linfonodos, fígado, esôfago e jejuno podem ser acometidos. Reação granulomatosa com hifas largas e esparsamente septadas e material eosinofílico são as características histopatológicas dessa condição, à semelhança de *B. ranarum* e *C. coronatus*. A infecção cursa com febre, tosse com hemoptise, anorexia, perda de peso e massas subcutâneas.

Diagnóstico laboratorial

- **Exame microscópico direto e histopatologia:** o exame direto com KOH 10% a 20% dos *espécimens* clínicos (lesões necróticas), infectados com membros da ordem Mucorales, permite a visualização de hifas asseptadas largas (7-15 μm) e irregularmente ramificadas em ângulo reto. Clamidósporos podem estar presentes, porém, esporângios são pouco frequentes. Algumas es-

pécies de *Mucor* e outros Mucorales produzem células de levedura em parasitismo ou à temperatura de 37 °C. Todas essas estruturas podem ser demonstradas de forma específica em preparações histopatológicas com ácido periódico de Schiff (PAS) ou Gromori-Grocott (prata). O estudo das seções teciduais com hematoxilina e eosina (HE) pode detectar a intensidade da angioinvasão pelos elementos hifálicos e a resposta inflamatória composta predominantemente por neutrófilos em indivíduos não imunocomprometidos. Invasão de tecido adjacente, trombоses, áreas nodulares, necróticas e hemorrágicas também podem ser visualizadas. Ao exame direto, as espécies da Ordem Entomophthorales se apresentam como hifas largas (3,5-10 μm), asseptadas ou esparsamente septadas, pouco ramificadas, de paredes refringentes e com inclusões granulares. Esses elementos teciduais também podem ser detectados por colorações micopatológicas. Em hematoxilina e eosina (HE), micélio asseptado envolvido por uma matriz eosinofílica (fenômeno de Splendore-Hoeppli) pode ser demonstrado. Diferentemente das espécies de Mucorales, a invasão vascular é extremamente rara em Entomophthorales.

- **Cultura:** o diagnóstico final de mucormicose é obtido pelo isolamento em cultura de agentes da ordem Mucorales; contudo, a cultura positiva não tem valor diagnóstico se o exame direto e/ou histopatologia forem inconclusivos. A visualização dos elementos fúngicos nos tecidos é fundamental para descartar a possibilidade de contaminação. De qualquer forma, a recuperação de Mucorales de pacientes de risco dever ser criteriosamente considerada, mesmo quando a contrapartida tecidual não estiver disponível. Os Mucorales crescem bem nos meios micológicos habituais: ágar Sabouraud dextrosado, com ou sem cloranfenicol, ágar batata dextrosado (BDA) e ágar à infusão de cérebro-coração (BHIA). Meios que sejam suplementados com cicloheximida (ágar mycosel, ágar micobiótico) não devem ser empregados, porque esses fungos são sensíveis à essa droga. Uma cultura extremamente algodonosa, de coloração acinzentada, pode estar presente, depois de um período de incubação de 24 a 48 horas, a 25 °C a 30 °C. A estrutura micromorfológica é caracterizada pela presença de hifas asseptadas e ramificadas, clamidósporos intercalares, esporangióforos e esporângios globosos ou digitiformes que contêm em seu interior grande quantidade de esporangiósporos. A cultura de Entomophthorales pode ser procedida também em meios ordinários, mas sem cicloheximida, por um período de 2 a 5 dias, a temperatura de 25 °C a 30 °C. A placa de Petri deve ser armazenada de forma invertida para permitir a ejeção de balistósporos produzidos por esses fungos. Após a incubação, uma colônia de aspecto ceroso ou pulverulento, coloração creme a acinzentada e com circunvoluções radiais está presente. As hifas são largas (8 a 20 μm) e esparsamente septadas com diferentes tipos de esporos assexuados (primários e replicativos) e sexuados (zigósporos) e clamidósporos.

Rhizopus (Ehrenberg ex) (Corda, 1838).

- **Morfologia macroscópica:** cresce rapidamente, atingindo a maturidade em 4 dias. As espécies potencialmente patogênicas crescem bem a 37 °C. A superfície é coberta com um denso micélio aéreo algodonoso, que lembra "algodão doce", de coloração cinza ou marrom-amarelado. O reverso é branco.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são hialinas, largas (6 a 15 μm), asseptadas ou muito raramente septadas. Numerosos estolões estão presentes entre as hifas do micélio, conectando grupos de longos esporangióforos que, usualmente, não são ramificados. No ponto onde os estolões e os esporangióforos se encontram, hifas semelhantes a raízes, denominadas rizoides, são produzidas. Os esporangióforos são longos (até 4 mm) e terminam em uma intumescência arredondada e escurecida, denominada esporângio (60 a 350 μm), que contêm uma estrutura curva, chamada de columela (fusão de pequenas vesículas), que divide o esporângio em duas partes, uma fértil, onde há a produção de esporos, por clivagem do citoplasma em torno de núcleos, que se dividem dentro do esporângio, e outra não fértil, representada pela parte inferior dos esporângios e do esporangióforo. Os esporângios contêm muitos esporos hialinos ou marrons, ovais, com 5 a 9 μm, conhecidos como esporangiósporos. Para a liberação desses esporos endógenos, é necessária a desintegração da parede do esporângio (membrana peridial). Não há formação de colarete, após a dissolução da parede. Esse gênero é diferenciado do *Mucor* pela presença de estolões, rizoides e esporangióforos, usualmente não ramificados, e da *Absidia* pela localização coincidente dos rizoides em relação ao esporangióforo e pela forma do esporângio.
- **Principais espécies:** *R. arrhizus, R. microsporus, R. oryzae, R. stolonifer.*

Lichtheimia (Vuill, 1903) (*Absidia* van Tieghem, 1876).

- **Morfologia macroscópica:** cresce rapidamente, atingindo a maturidade em 4 dias. A superfície é cinza, algodonosa e áspera. O micélio aéreo cobre prontamente o ágar e apresenta uma textura semelhante a "algodão doce". O reverso é branco.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são hialinas, largas (6-15 μm), asseptadas (ou raramente septadas). A estrutura é semelhante a do *Rhizopus* spp., exceto pelo fato dos esporangióforos de *Lichtheimia* sp. se desenvolverem entre os rizoides nos estolões e não em oposição a esses. Além disso, os esporangióforos são ramificados e maiores, e formam apófises logo abaixo da columela. A columela é semicircular com

uma pequena projeção no topo. Os esporangiósporos (20 a 120 μm) são levemente piriformes ou esféricos. Quando a parede dos esporângios se dissolve, um pequeno colarete frequentemente se mantém na ponta em que o esporângio se insere no esporangióforo.

- **Principais espécies:** *L. corymbifera (A. corymbifera)* e *L. ramosa*.

Mucor (Michaeli ex Sant-Amans, 1821).

- **Morfologia macroscópica:** cresce rapidamente, alcançando a maturidade em 4 dias. Um micélio aéreo exuberante e algodonoso é produzido, cobrindo a superfície do meio com crescimento semelhante a "algodão doce" que, inicialmente, é branco e torna-se cinza, subsequentemente. O reverso é branco.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são hialinas, largas (6-15 μm) e praticamente não septadas. Os esporangióforos são longos, frequentemente ramificados e dão origem a um esporângio globoso terminal, preenchido com esporangiósporos (60 a 300 μm). A parede do esporângio se dissolve, liberando os esporos (4 a 7 μm) arredondados ou levemente oblongos e revelando a columela que, algumas vezes, produz um colarete na base de inserção do esporangióforo. Não há formação de rizoides.
- **Principais espécies:** *M. circinelloides, M. hiemalis, M. indicus, M. ramossissimus.*

Rhizomucor (Lucet et Costantin) (Wehmer ex Vuillemin, 1931).

- **Morfologia macroscópica:** cresce rapidamente, atingindo a maturidade em 4 dias. Alguns membros do gênero são termófilos (50 °C-58 °C). A colônia é altamente algodonosa, com uma textura de "algodão doce". Inicialmente, a coloração é cinza, tornando-se marrom-escuro, com o tempo. O reverso é branco.
- **Morfologia microscópica:** o fungo parece ser intermediário entre o *Rhizopus* e o *Mucor*. As hifas são hialinas largas e asseptadas (ou raramente septadas). Os esporangióforos são marrons, ramificados, e se elevam de estolões que estão fixados ao ágar por rizoides pouco desenvolvidos, lembrando, às vezes, a forma de espinhos. Pequeno número de rizoides são encontrados nos estolões. Os esporângios são globosos, escuros e medem 40 a 100 μm ou mesmo 150 μm. Os esporangióforos são globosos a subglobosos e pequenos (3 a 4 μm). A columela varia de globosa ou subglobosa a ligeiramente piriforme com ou sem apófise, que, se presente, é pequena.
- **Principal espécie:** *R. pussillus.*

Syncephalastrum (Shröter, 1886).

- **Morfologia macroscópica:** cresce rapidamente, alcançando a maturidade em 3 dias. O crescimento aéreo é exuberante e semelhante a "algodão doce". Inicialmente, a coloração é branca, tornando-se cinza-escuro ou quase negro. O reverso é branco.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são hialinas, largas (4-8 μm) sempre asseptadas (septos irregulares podem ser vistos em colônias "velhas"). Os esporangióforos são pequenos, ramificados e têm uma extremidade dilatada, formando uma vesícula globosa a ovoide. A partir dessas estruturas, esporângios (merosporângios) tubulares ou digitiformes (4-6 × 9-60 μm), contendo uma única fileira ou cadeia de esporangiósporos globosos, ovais ou cilíndricos, são formados. Rizoides são, usualmente, produzidos. Esses organismos podem, inicialmente, lembrar o *Aspergillus niger*, mas um exame cuidadoso revela os esporângios tubulares e a ausência de septos e de fiálides.
- **Principal espécie:** *S. racemosum*.

Cunninghamella (Matruchot, 1903).

- **Morfologia macroscópica:** cresce rapidamente, alcançando a maturidade em 4 dias. A superfície é muito algodonosa, semelhante a "algodão doce", sendo branca, no início, mas tornando-se cinza, posteriormente.
- **Morfologia microscópica:** as hifas são hialinas, largas e asseptadas. Os esporangióforos são longos, ramificados e terminam em vesícula dilatada (30 a 65 μm). As vesículas são cobertas com espículas ou dentículos que suportam um pequeno esporângio (esporangiolo) globoso a subgloboso (5 a 8 × 6 a 14 μm), que contém um único esporangiósporo unicelular, esférico a oval. A parede do esporângio é frequentemente ornamentada com espículas.
- **Principal espécie:** *C. berthiolletiae.*

Conidiobolus coronatus (Costantin) (Batko, 1964).

- **Morfologia macroscópica:** cresce rapidamente a 30 °C -37 °C, alcançando a maturidade em 5 dias. A colônia é plana, glabrosa, cerosa, de coloração creme, amarela a cinza, tornando-se pulverulenta e coberta por pequenas hifas aéreas brancas. Com o tempo, torna-se marrom-amarelada ou marrom escura. O reverso é branco.
- **Morfologia microscópica:** as hifas têm poucos septos, os esporóforos são eretos, não ramificados, medem de 12 a 18 × 60 a 90 μm e dão origem, em suas extremidades, a esporos unicelulares e multinucleados, e esféricos a piriformes. Os esporos primários maduros (25 × 45 μm) são expelidos violentamente dos esporóforos. Esses esporos apresentam uma proeminente papila basal com bordas arredondadas, que marca o ponto de ligação com o esporóforo, e estão envoltos em uma substância aderente. O esporo liberado pode formar um tubo germinativo e dar origem a um esporo secundário (replicativo), ou pode formar diversos pequenos

filamentos que dão origem a esporos secundários, que cobrem toda a superfície do esporo primário, formando uma "coroa de esporos", e, ainda, podem produzir múltiplos pequenos apêndices ou vilosidades que formam uma estrutura denominada "esporo viloso". Clamidósporos podem ser produzidos por algumas cepas. Zigósporos são raros.

Basidiobolus ranarum (Eidam, 1887).

- **Morfologia macroscópica:** cresce rapidamente a 30 °C-37 °C, atingindo a maturidade em 5 dias. A superfície é delgada, plana, cerosa e de coloração creme, amarela a cinza ou cinza-esverdeado, tornando-se elevada, com dobras e sulcos radiais, marrom-acinzentado e coberta com pequenos tufos de micélio aéreo branco. O reverso é branco. Algumas amostras têm "cheiro de terra".
- **Morfologia microscópica:** as hifas são grandes (8 a 20 μm), ocasionalmente septadas, mas que se tornam altamente septadas com a produção de esporos. Após 7 a 10 dias, a colônia torna-se desenvolvida com micélio abundante e zigósporos, clamidósporos, esporóforos e esporos assexuados sendo formados. Os zigósporos são globosos (20 a 50 μm) e têm uma espessa parede lisa a ondulada, com um proeminente "bico" em um de seus lados. Os clamidósporos, produzidos mais abundantemente em culturas antigas, têm de 20 × 24 μm de diâmetro. Os esporóforos apresentam uma dilatação cônica ou vesícula em sua extremidade (alargamento propulsivo terminal), onde são formados esporos globosos primários unicelulares. Os esporos são liberados violentamente para o exterior, levando junto um fragmento da porção superior da dilatação cônica ou vesícula. Esporos secundários (replicativos) são formados na extremidade de finos e longos filamentos (esporóforos), originados do esporo primário. Esses esporos são alongados, apresentam-se em forma de "taco" com uma ponta delgada e estrutura globosa terminal, sendo envolvidos por substância adesiva e liberados passivamente.
  - **Métodos não culturais:** O emprego de tomografia computadorizada, ressonância magnética e angiografia é útil para a localização das anormalidades pulmonares, rinocerebrais ou vasculares e planejamento cirúrgico. Sorologia não está disponível para uso clínico e o biomarcador panfúngico 1-3-β-D-glucana não pode ser aplicado porque essa substância não está presente na rede celular dos Mucorales. A PCR e suas variações e a protêomica por MALDI-TOF MS têm sido promissoras para a identificação de isolados de zigomicose.

Diagnóstico diferencial

Devem ser considerados: *Mucormicose:* Aspergilose e pseudallescheriose cerebral e/ou pulmonar, pneumonia por *Pseudomonas aeruginosa*, sinusite bacteriana e celulite orbital bacteriana. *Basidobolomicose:* Sarcoma de tecidos moles, micetoma, helmintoses, celulite bacteriana e paniculite fibrosante. *Conidiobolomicose:* Carcinoma de seios maxilares, granulomatose de Wegener, paracoccidioidomicose, tuberculose, leishmaniose e oncocercose.

Prognóstico e tratamento

O prognóstico é reservado a ruim, dependendo da patologia de base e/ou da efetividade da quimioterapia antifúngica, bem como da terapia do processo primário e de suporte. O tratamento apropriado melhora o prognóstico e eleva as taxas de sobrevivência. O tratamento da mucormicose consiste de intervenção cirúrgica para desbridamento de massas subcutâneas, material necrótico e outros tecidos infectados, terapia antifúngica com altas doses de anfotericina B e suas preparações tradicional, lipossomal e lipídicas, azoles (cetoconazol, fluconazol, itraconazol e posaconazol), terapia com oxigênio hiperbárico, que melhora a capacidade oxidativa dos neutrófilos e inibe diretamente o crescimento fúngico, controle da acidose metabólica e suspensão da terapia com deferoxamina e corticosteroides. Resultados favoráveis com a aplicação tópica e oral de substâncias à base de iodo têm sido relatados. As equiocandinas/pneumocandinas (caspofungina) e os derivados azólicos (ravuconazol e voriconazol) não são efetivos frente aos membros da ordem Mucorales. A basidiobolomicose e a conidiobolomicose podem ser tratadas com solução saturada de iodeto de potássio, sulfametoxazol com trimetoprima, cetoconazol, cotrimaxazol, fluconazol, itraconazol, anfotericina B e suas formulações, e cirurgia.

OUTRAS INFECÇÕES FÚNGICAS

Basidiomicose

O Filo Basidiomycota contém fungos extremamente comuns na natureza, sendo a maioria encontrada como saprófobio de solo ou associado a micorrizas. Em termos de infecção, os Basidiomycota são capazes de produzir doença em vegetais e, em decorrência disso, são considerados importantes fitopatógenos, todavia, são incomuns causando micoses em animais e seres humanos. Classicamente, esses organismos são filamentosos, mas há fungos leveduriformes ou fungos que contêm um estado leveduriforme em seu ciclo vital. As hifas são septadas, hialinas e ramificadas com grampos de conexão, originando um micélio dicariótico. Os Basidiomycota têm reprodução sexuada, produzindo basídias e basidiósporos, e assexuada, formando conídios ou blastósporos. Com relação à patologia humana, esse grupo é mais reconhecido como agente de micetismo, tendo em vista apresentar toxinas endógenas, que são elementos plásticos ou constitutivos, e que, quando ingeridos, produzem quadros de intoxicação grave. Algumas vezes, os Basidiomycota podem desencadear crises

alérgicas em indivíduos hipersensíveis aos seus antígenos. Os relatos de infecção humana incluem, com mais frequência, a *Filobasidiella* sp. que é a fase sexuada de *Cryptococcus* sp. Outros gêneros de Basidiomycota isolados de casos de doença são o *Coprinus* sp., *Schizophyllum* sp. e *Ustilago* sp. As principais manifestações clínicas observadas incluem endocardites, meningoencefalites, ulcerações no palato, sinusites, endoftalmites, fungemias, onicomicoses e lesões cutâneas.

Geotricose

A geotricose é uma infecção causada por fungos dos gêneros *Geotrichum* e *Saprochaete*. A enfermidade acomete pulmões, trato intestinal, cavidade oral e pele. Até recentemente, o único agente infeccioso considerado era o *Geotrichum* sp., todavia, a partir de estudos moleculares, esse foi separado nos gêneros *Geotrichum* (Teleomorfo: *Glactomyces* e *Dipodascus*) e *Saprochaete* (Teleomorfo: *Magnusiomyces*). Em termos Filogenéticos, esses fungos se relacionam com o Filo Ascomycota e a Ordem Saccharomycetales, sendo, portanto, produtores de ascos com ascósporos em sua fase sexuada (teleomórfica). As espécies mais prevalentes na clínica são o *Geotrichum candidum* e a *Saprochaete capitata* (anteriormente *Geotrichumcapitatum*, *Trichosporon capitatum* ou *Blastoschizomyces capitatus*). Esses fungos são cosmopolitas e ubiquitários, podendo ser encontrados no solo, material vegetal, frutas cítricas, legumes, leite, queijos, além da microbiota da pele, mucosas e vias respiratórias dos hospedeiros. Esses fungos têm sido isolados de cavidade bucal, conduto auditivo externo, escarro, urina, fezes e secreções vaginais. Têm sido isolados também de ambientes hospitalares, particularmente, em unidades de terapia intensiva, e são capazes de colonizar e formar biofilmes em cateteres, sondas e próteses. Em decorrência de seu comportamento ecoepidemiológico, podem produzir infecções exógenas, a partir do meio ambiente, pela inalação de elementos fúngicos em suspensão no ar, e/ou endógenas, em função da microbiota, pela presença das estruturas fúngicas colonizantes nos tecidos. A geotricose acomete todas as faixas etárias, sendo mais prevalente em adultos. Afeta homens e mulheres sem distinção, tendo o sexo feminino, no entanto, um ligeiro predomínio. A enfermidade não é considerada um problema ocupacional, todavia, profissionais de laticínios, sobretudo queijeiros, parecem estar mais expostos. A doença tem distribuição mundial, sendo encontrada na Europa (França, Itália e Espanha) e nas Américas. De maneira geral, esses fungos se comportam como oportunistas e, com frequência, estão associados a condições de imunocomprometimento. Fatores predisponentes incluem o diabetes, linfomas, leucemias, HIV, tuberculose, corticoterapia e citostáticos. As manifestações clínicas são variadas, apresentando formas pulmonares, bronquiais, intestinais, orais, cutâneas, ótica, disseminada e fungemias. A geotricose pulmonar envolve o parênquima do órgão e é semelhante à tuberculose ou mesmo secundária a essa enfermidade, pois os fungos podem colonizar as cavidades que ficaram como sequelas da infecção bacteriana. O quadro clínico cursa com febre, taquicardia, tosse com expectoração mucopurulenta e hemoptise. A radiografia de tórax mostra, na parte superior dos pulmões, infiltrados lisos e densos, uni ou bilaterais e cavitações. Normalmente, a doença pulmonar é exógena e crônica, exibindo grande mal-estar geral. Pode ser, todavia, progressiva e fatal em indivíduos em corticoterapia. Uma apresentação broncopulmonar pode estar presente. O fungo se desenvolve também na luz dos brônquios, produzindo, ainda, uma sintomatologia de asma grave. Alguns pacientes podem apresentar associadamente sintomas gastrointestinais, urticária crônica e rinite. A forma bronquial é endógena, o parênquima pulmonar não é acometido e a sintomatologia se assemelha a uma bronquite. Os pacientes apresentam tosse crônica intensa e expectoração mucoide ou gelatinosa pouco sanguinolenta. Na geotricose bronquial, há ausência de febre e o estado geral não é comprometido. As imagens radiográficas mostram engrossamento peribronquial difuso com áreas opacas na base dos pulmões. A broncoscopia revela a presença de placas esbranquiçadas com fundo avermelhado. A forma oral afeta a língua, palato, gengivas, bochechas, mucosa jugal, mucosa e comissura labial, e se caracteriza por placas eritematosas e pseudomembranosas, acompanhadas de ardor. A geotricose oral está mais associada a diabetes, neoplasias hematológicas, linfomas e à antibioticoterapia. Úlceras de caráter progressivo no palato duro podem surgir em pacientes com leucemia aguda. A geotricose intestinal cursa com enterocolite, dor abdominal e diarreia, e está normalmente relacionada com o HIV. A forma cutânea pode se apresentar mais superficial com lesões nas regiões submamárias, interglúteas, interdigitais, axilares e inguinais de aspecto úmido, eritematoso, descamativo, macerativo e pruriginoso. Esses fungos podem acometer, ainda, as unhas dos quirodáctilos que se tornam quebradiças, estriadas, descoloradas com onicólise e inflamação periungueal. Lesões profundas têm sido descritas e exibem uma formação nodular com aspecto tumoral e osteólise. Em geral, as lesões tegumentares estão associadas a diabetes, patologias que levam ao imunocomprometimento como leucemias, linfomas e HIV, além de transplantes de medula óssea e quimioterapia antineoplásica. A doença ótica é um processo endógeno que acomete o conduto auditivo externo, apresentando áreas eritematosas, micropústulas, placas esbranquiçadas, bem como hipoacusia e prurido ótico. Infecções generalizadas e fungemias podem ocorrer por veiculação por cateter ou disseminação de outros focos, afetando vários tecidos e órgãos internos em pacientes neutropênicos e imunocomprometidos. Para o diagnóstico laboratorial, deve ser realizado, inicialmente, o exame direto da amostra clínica com KOH a 10% a 20%. Microscopicamente, poderá ser visualizada a presença de hifas hialinas septadas com artrósporos retangulares, que podem torna-se esféricos, tomando uma forma de levedura. A histopatologia pode ser realizada com o emprego de ácido periódico de Schiff (PAS) e Gromori-Grocott (prata), que permitem a visualização dos filamentos hifálicos e os artrósporos. O isolamento de *Geotrichum* sp. e *Saprochaete* sp. pode ser obtido em meios micológicos usuais sem cicloheximida, como ágar Sabouraud dextrosado (SDA), incubados a temperatura de 25 °C, por 2 a 5 dias. As colônias exibem coloração branca e aspecto viloso,

pregueado e radiado, e textura úmida. Como no exame direto da amostra clínica, o estudo micromorfológico da cultura com azul de algodão revela a presença de hifas septadas, hialinas e ramificadas com artrósporos quadriláteros e em cadeia, que se tornam arredondados, lembrando células de levedura. Se essas células germinam, produzem outros artrósporos, mas nunca blastósporos. Aneloconídios podem estar também presentes. Esses fungos não assimilam a glicose e galactose, não desdobram a albumina, não reduzem o tetrazólio, não fermentam carboidratos e são urease-negativos. Dependendo do sítio e da forma de infecção, a geotricose deve ser diferenciada com tuberculose, aspergilose, candidíase, criptococose, mucormicose, dermatofitoses, tricosporonose, malasseziose, sarcoidose, amebíase e psoríase. A geotricose pode apresentar um prognóstico bom a reservado e, nos casos de profundo imunocomprometimento, ruim. Esses fungos são sensíveis a itraconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina, nistatina e anfotericina B.

Infecção por *Rhodotorula* spp.

Rhodotorula spp. são contaminantes comuns de laboratório que, normalmente, produzem uma infecção oportunista em pacientes imunocomprometidos (linfoma, leucemia e transplantados), com uma taxa de mortalidade em torno de 20%. Essa levedura produz, tipicamente, uma coloração alaranjada em suas colônias devido à presença de pigmentos carotenoides. Além de alaranjadas, as colônias são lisas ou rugosas, brilhantes e mucoides. As células de leveduras são ovoides (2 a 7 μm), unibrotantes, podem produzir pseudomicélio rudimentar e uma cápsula quase vestigial. Esse fungo não fermenta a glicose, mas hidrolisam ureia e, a 25 °C, crescem em 2–3 dias em meios de rotina como ágar Sabouraud dextrosado sem cicloheximida. Existem mais de 30 espécies de *Rhodotorula*, todavia, as três que apresentam importância clínica são a *Rhodotorula mucilaginosa* (*Rhodotorula rubra*), com taxa de 75% a 80%, *Rhodotorula glutinis,* com percentuais de 15%, e *Rhodotorula minuta,* de ocorrência mais esporádica. A identificação das espécies é feita por padrão bioquímico de carboidratos. Filogeneticamente, estão associadas com os Basidiomycota. *Rhodotorula glutinis* é a única espécie com estado teleomorfo conhecido, denominado *Rhodosporidium diobovatum*. A levedura é de distribuição universal, sendo isolada de ambientes úmidos (solo e água) e humanizados (hospitais), alimentos (queijos e produtos lácteos), pele e mucosa dos animais e seres humanos. Não existe predomínio de sexo, raça e idade, mas idosos são mais susceptíveis. Apesar de colonizar pele, vias aéreas, tubo digestivo e vias urinárias, podem também produzir infecções disseminadas em pacientes hospitalizados, afetando pulmões, rins e sistema nervoso central. Não existe predomínio de idade e sexo. *Rhodotorula* spp. são principalmente veiculadas por cateteres intravenosos de longa duração, sondas permanentes e outros dispositivos médicos como próteses valvulares ou cateter de diálise peritoneal. Pode haver surtos pseudoepidêmicos por contaminação de fibrobroncoscópios. As principais manifestações clínicas incluem fungemias, endocardites, meningites, peritonites, nefrites e infecções oculares (queratite, endoftalmite, dacriocistite). O diagnóstico pode ser procedido utilizando-se exame microscópico direto da amostra clínica e/ou colorações histopatológicas. Consecutivamente, emprega-se o ágar Sabouraud dextrosado (SDA) ou o ágar batata dextrosado (BDA) e provas de assimilação de carboidratos. A enfermidade tem um prognóstico reservado a ruim, condicionado ao *status* de saúde dos hospedeiros. Normalmente, há uma boa resposta ao voriconazol e à anfotericina B. Esses fungos são intrinsecamente resistentes ao fluconazol e exibem baixa susceptibilidade às equinocandinas/pneumocandinas.

Sacaromicetose (infecção por *Saccharomyces* spp.)

As infecções produzidas por *Saccharomyces* spp. são tipicamente oportunistas, estando, em geral, associadas a pacientes com neoplasias hematológicas (leucemia e lifomas), transplantados e HIV-SIDA. A levedura tem ampla distribuição na natureza, sendo encontrada em solos, vegetais e frutas. Além disso, pode ser encontrada como membro da microbiota de trato gastrointestinal, respiratório e genital. A principal espécie envolvida nos casos de infecção é o *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. O fungo pode ser veiculado para o tecido dos hospedeiros através de cateter venoso central, diálise peritoneal ou cirurgia. A translocação da mucosa intestinal para a corrente sanguínea tem sido proposta como uma outra forma da levedura atingir áreas profundas, passando de um estado comensal a um estado expoliativo. Clinicamente, pode produzir lesões semelhantes àquelas observadas em candidíase, como pneumonias, abscessos hepáticos, estomatites, endocardites, peritonites, uretrites, vaginites, diarreias, fungemias e biofilmes. Tem sido relatada uma taxa de mortalidade de cerca de 30%. O uso de probióticos contendo a variedade *boulardii* tem sido relacionado a fungemias em indivíduos que fizeram uso dessas substâncias, como prevenção de diarreia por *Clostridium difficile*. O diagnóstico micológico é realizado com certa facilidade. No exame direto ou a partir de colorações histopatológicas, como ácido periódico de Schiff (PAS) ou Gromori-Grocott (prata), é possível observar células de levedura de 4-8 μm de diâmetro. Para o isolamento, podem ser empregados os meios de cultura de rotina como o ágar Sabouraud dextrosado (SDA). Após 24-48 °C, surgem colônias mucoides, brilhantes, úmidas e de coloração esbranquiçada. Microscopicamente, se visualizam células leveduriformes ovoides, monogemulantes ou multibrotantes e pseudohifas (pequenas e rudimentares). Em ágar V8, é possível se obter a forma sexuada com ascos contendo 4 ascósporos álcool-ácido resistentes (coloração Kufferat). A identificação definitiva é dada por seu perfil de assimilação de carboidratos. Em Chromagar-*Candida*, possui coloração violeta semelhante à *Candida glabrata*. O fungo tem prognóstico reservado a ruim para as formas sistêmicas e invasivas. *Saccharomyces* spp. são sensíveis ao fluconazol, itraconazol, nistatina e anfotericina B.

Talaromicose (infecção por *Talaromyces marneffei*)

Talaromicose é uma enfermidade que acomete o sistema retículo endotelial e seus órgãos, tais como a medula óssea, gânglios, placas de Peyer, fígado e baço. Além disso, o sistema nervoso central, pulmões, rins coração, trato gastrointestinal e pâncreas também podem ser afetados. O agente etiológico é *Talaromyces marneffei* (anamorfo *Penicillium marneffei*), um fungo dimórfico produtor de ascos com ascósporos, que se relaciona filogeneticamente com o subgênero *Biverticillium* e com as outras espécies teleomórficas de *Talaromyces*. Esse organismo tem sido isolado de ratos do bambu e de solo, que parecem ser suas fontes naturais, de regiões endêmicas do sudeste asiático como Tailândia, Maniput, Índia, sul da China, Hong Kong, Taiwan, Vietnã, Laos, Camboja, Filipinas, Myanmar, Malásia, Singapura, Indonésia e Japão. Em áreas não endêmicas, tem sido relatado nos Estados Unidos, Argentina, Holanda, Itália, França, Inglaterra, Gana e Austrália. As portas de entrada são a inalação, traumatismo e ingestão ou disseminação entérica após o consumo de ratos do bambu. O contato com as fezes, secreções e material contaminado desses roedores é outra forma de contágio. Períodos chuvosos, igualmente, parecem propiciar a infecção, pela maior exposição com solos úmidos, lama e lodo contaminados. A doença acomete ambos os sexos, com prevalência em homens (7:1), e todas as faixas etárias, variando de 4 meses a 72 anos, com média de idade de 35 anos. Não tem sido observada incidência específica em etnias ou atividades profissionais particulares, contudo, há relatos de exposição ocupacional de profissionais de laboratório clínico à fase filamentosa do *T. marneffei*. A talaromicose tem uma ocorrência esporádica em pacientes imunocompetentes, sendo, todavia, mais prevalente em pacientes imunocomprometidos, que apresentam como patologias de base a Aids com baixa contagem de CD4+ (50 a 100 células/mm^3), considerada o principal fator predisponente, linfoma, anemia hemolítica, neoplasias pulmonares, fibrose cística, lúpus eritematoso sistêmico, transplantados e corticoterapia. As manifestações clínicas mais comuns são febre, astenia, anorexia, fadiga, perda de peso, linfoadenopatias periféricas e mesentéricas, hepatoesplenomegalia, cefaleia e tosse persistente (pneumonia), bem como diarreia, anemia, leucocitose ou leucopenia, trombocitopenia e lesões cutâneas com nódulos, gomas, abscessos, úlceras (não genitais), pústulas e pápulas em vários sítios como face, pescoço e tronco. Há edemas e artrites nas articulações coxofemoral e temporomandibular, ossos longos, crânio, vértebras e escápula. Além dessas alterações, os pacientes com HIV exibem ainda lesões na mucosa do palato, boca e laringe, lesões cutâneas e subcutâneas acneiformes, moluscoides e necróticas, e úlceras genitais. A ocorrência da doença nas áreas endêmicas pode ser devido a uma infecção primária ou à reativação de focos latentes. De maneira geral, a apresentação clínica da talaromicose se assemelha à histoplasmose disseminada subaguda. O diagnóstico laboratorial é realizado a partir da histopatologia, já que o exame direto a fresco é de pouca utilidade. As colorações de Giemsa, Wright, hematoxilina e eosina (HE), e ácido periódico de Schiff (PAS) permitem observar, no interior das células, elementos leveduriformes (2 a 4,5 μm), de aspecto arredondado, com um septo central típico. No tecido, essas estruturas são semelhantes ao *Histoplasma capsulatum*, *Leishmania* sp. e *Toxoplasma* sp. O *T. marneffei* cresce facilmente nos meios micológicos usuais sem cicloheximida, como o ágar Sabouraud dextrosado, em temperatura de 25 °C. Em dois ou três dias, surge uma colônia de textura granular, inicialmente esbranquiçada e, posteriormente, verde-amarelada ou verde-escuro ou, ainda, cinza-azulada ou cinza-esbranquiçada, com reverso de coloração avermelhada ou marrom-escuro. Pode haver, também, a produção de um pigmento difusível de coloração avermelhada especialmente em ágar batata dextrosado (BDA). O fungo se reproduz caracteristicamente como um *Penicillim* sp. com hifas septadas, hialinas e ramificadas, conidióforos ramificados com ramos e métulas e fiálides com conídios globosos, lisos ou rugosos em cadeia. Na temperatura de 37 °C, em meio ágar infusão de cérebro-coração (BHIA), as colônias são leveduriformes, cremosas, rugosas ou pregueadas e com coloração que varia de branco acinzentado a branco rosado e pigmento vermelho escuro pouco difusível. A morfologia microscópica é composta por células de levedura ovaladas ou elipsoides, com um septo central, que se reproduzem apenas por divisão binária. O diagnóstico da doença pode ser, ainda, realizado por sorologia para anticorpos, utilizando técnicas convencionais como imunofluorescência e *Western Blot*, ou pela biologia molecular, empregando a PCR e suas variações. A detecção de antígenos, como as galactomananas na urina, pode ser auxiliar no diagnóstico da forma disseminada. A talaromicose deve ser diferenciada de histoplasmose, criptococcose, esporotricose, pneumocistose, prototecose, leishmaniose, toxoplasmose, tuberculose e outras infecções por *Micobacterium* e sarcoma de Kaposi. O prognóstico da doença é reservado a ruim, dependendo do tipo de infecção, se cutânea ou disseminada, e do *status* imune do paciente. O *T. marneffei* é sensível à maioria das drogas antifúngicas de uso clínico, podendo, por isso, ser empregado o itraconazol, voriconazol, posaconazol, micafungina e anfotericina B.

Queratomicose e otomicose

A queratomicose é a infecção ocular causada pela invasão fúngica no estroma da córnea. Normalmente, é de curso subagudo e estão presentes inflamação e úlcera de córnea. Os agentes etiológicos envolvidos são fungos oportunistas, incluindo *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Candida* sp., *Cladodosprium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Scedosporium* sp. e *Scopulariopsis* sp. No entanto, *Fusarium solani* tem sido o agente mais isolado dos casos de queratite micótica. Apesar das espécies fúngicas que causam infecções na córnea serem extremamente diversas, tendo em vista existirem mais de 60 espécies relatadas, as manifestações clínicas observadas são indistinguíveis entre elas. Os fungos envolvidos nesses processos são amplamente distribuídos na natureza, estando presentes

no ar, água, solo e vegetais. A porta de entrada mais comum é o traumatismo e o uso continuado de antimicrobianos e esteroides. Uma forma de aquisição frequente de infecção é o uso de lentes de contato e/ou de soluções de limpeza de lentes contaminadas. Essa micose é cosmopolita, sendo encontrada em todos os países do mundo, no entanto, é mais comum naqueles em desenvolvimento. Os adultos são mais acometidos e os indivíduos de áreas rurais ou com atividades agrícolas são os mais predispostos. O período de incubação varia de uma a duas semanas após o traumatismo. Indubitavelmente, lesões traumáticas por corpos vulnerantes de natureza vegetal são os principais fatores facilitadores de infecção, todavia, cirurgias oculares, como as de catarata e transplantes de córnea, têm sido relatadas. Com a implantação traumática do fungo na córnea, ocorre um grande processo inflamatório, fotofobia, dor, ardor, perda da acuidade visual, eritema conjuntival, aumento da vascularização, formação de pregas na membrana de Descemet e hipópio (pus na câmara anterior do olho). Consecutivamente, há a formação de uma úlcera irregular, com frequência em posição central, contudo, pode ser paracentral ou periférica, de coloração esbranquiçada a amarelada ou, ainda, acinzentada, de bordos elevados, que aumenta em extensão e profundidade. A úlcera pode ser, excepcionalmente, pigmentada por conta de infecções por fungos demáceos. Quando o processo é crônico, ocorrem lesões satélites, neurovascularização, hipópio, opacidade corneal, perfuração da úlcera, endoftalmite e cegueira. Em pacientes imunocomprometidos, pode haver disseminação e invasão cerebral. Outras lesões oculares associadas são infecção de pálpebras (blefarite micótica), infecção do sistema lacrimal, infecção de conjuntiva, infecção de esclera, infecção de úvea, infecção intraocular (endoftalmite e coriorretinite) e infecção do nervo óptico. O material clínico deve ser coletado com o paciente acordado e com o olho anestesiado. A coleta deve ser procedida na base e no bordo da úlcera com um bisturi oftalmológico ou espátula de Kimura estéril. O material deve ser coletado em duplicata, para procedimentos de exame direto e cultura. Todavia, não sendo possível duas amostras, coleta-se apenas uma para se proceder o isolamento fúngico em cultura. O exame direto com KOH 10% a 20% puro ou com tinta Parker permite a observação de hifas septadas, hialinas ou demáceas e ramificadas e conídios ou, então, células de levedura, blastósporos e pseudohifas. Colorações histopatológicas podem ser procedidas com ácido periódico de Schiff (PAS), Gromori-Grocott (prata), Giemsa e Gram. Branco de calcoflúor pode ser também empregado. De forma geral, essas provas têm baixa sensibilidade e especificidade, exibindo percentuais de até 70%, o que pode levar a resultados falso-negativos. O isolamento fúngico pode ser procedido em meios de rotina micológica como o ágar Sabouraud dextrosado (SDA), ágar batata dextrosado (BDA), ágar sangue e ágar infusão de cérebro-coração (BHIA), com antibióticos, mas sem cicloheximida, a 25 °C -37 °C, por 24-48 horas, para os fungos leveduriformes, e, por 10 a 15 dias, para os filamentosos. A cultura é positiva em percentuais de até 94%. Provas moleculares, utilizando PCR e suas variações, podem ser úteis. O diagnóstico diferencial deve ser procedido com queratomicoses bacterianas e virais, úlceras por corpo estranho, úlceras secundárias à paralisia facial, úlceras serpiginosas, úlcera de Mooren e queratite dendrítica. O prognóstico das queratites micóticas pode ser ruim, em decorrência de complicações ligadas ao diabetes descompensado em cetoacidose ou imunocomprometimentos por diversas causas, e pela pouca penetração das drogas no sítio infeccioso. Os agentes dessa condição clínica são sensíveis à natamicina, pimaricina e sulfadiazina, aos derivados azólicos (miconazol, clotrimazol, econazol, cetoconazol, fluconazol, itraconazol e voriconazol), aos derivados da equinocandinas/pneumocandina (caspofungina) e aos derivados poliênicos (anfotericina B).

A otomicose, por sua vez, é uma micose superficial determinada por fungos oportunistas, com frequência, do gênero *Aspergillus*. Além do *Aspergillus,* tem sido relatado outros fungos contaminantes que existem na natureza como sapróbios de solo e vegetais ou como comensais do conduto auditivo externo, tais como o *Acremonium* sp., *Candida* sp., *Epidermophyton floccosum*, *Fusarium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Scedosporium* sp., *Scopulariopsis* sp., *Trichophyton* sp. e *Trichosporon* sp. A enfermidade afeta quase exclusivamente o conduto auditivo externo e tem uma evolução crônica a subaguda. A doença é cosmopolita, mas prevalente em regiões quentes e úmidas. A otomicose ocorre em pessoas de qualquer idade, raça e sexo. Há relatos de que adultos jovens e de meia idade e mulheres são os mais acometidos. Em termos ocupacionais, nadadores, mergulhadores e salva-vidas são as profissões mais afetadas. O uso excessivo de antimicrobianos e corticosteroides tópicos, a utilização frequente de cotonetes, cirurgias otorrinolaringológicas e pacientes com diabetes, leucemia e linfomas predispõem ao desenvolvimento da infecção. As manifestações clínicas frequentemente relatadas incluem inflamação, descamação, dor (otalgia), prurido, ardor, sensação de queimação, sensação de corpo estranho, eritema e edema. Otorreia é raramente informada. Além disso, se observa a presença de massas esbranquiçadas a acinzentadas que levam à hipoacusia. A otomicose pode ser uni ou bilateral e, conforme com o *status* imunológico dos pacientes, pode disseminar para outras áreas adjacentes. Excepcionalmente, os fungos podem acometer o pavilhão auricular ou produzir perfuração de tímpano ou mesmo causar infecção do osso temporal, otomastoidites e meningoencefalites. A destruição da membrana timpânica pode levar à surdez definitiva. A utilização de otoscópios permite a visualização de cerume, concreções claras com aspecto aveludado, feltroso ou pulverulenta, com zonas puntiformes mais escuras de coloração acinzentada, marrom, verde ou negra. Tampões de textura algodonosa ou membranosa podem estar presentes. As amostras podem ser coletadas do conduto auditivo externo com espátula ou com um *swab* e devem ser obtidas em duplicata, para exame microscópico e cultura em meios sólidos. O exame direto pode ser realizado com KOH 10% a 20% e colorações histopatológicas com ácido periódico de Schiff (PAS) e Gromori-Grocott (prata). Nessas provas, se observam hifas septadas, hialinas ou demá-

ceas, ramificadas, conídios e, sendo o *Aspergillus* sp., é possível observar, claramente, as cabeças aspergilares. A cultura para fungos é procedida nos meios micológicos de rotina, como o ágar Sabouraud dextrosado (SDA), ágar batata dextrosado (BDA) e ágar Czapek-Dox; contudo, em todos os meios, a cicloheximida não deve ser adicionada. As amostras clínicas devem ser incubadas à temperatura de 25 ºC, por três a cinco dias, ou até duas semanas. A biologia molecular pode ser empregada, mas provas imunológicas ou sorológicas não estão, ainda, padronizadas. De acordo com a literatura, *Aspergillus* sp. tem taxas de incidência de 80% e *Candida* sp. de 15%. O diagnóstico diferencial deve ser realizado frente à otite bacteriana, dermatite seborreica, impetigo, dermatite por contato, furunculose e meningite tuberculosa. As *tineas* da cabeça e pescoço podem se estender até o pavilhão auricular, simulando uma otite. O prognóstico é bom, mas a enfermidade é crônica e recorrências são comuns. Os fungos são sensíveis à tolciclato, clotrimazol, miconazol, isoconazol, bifoconazol, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, ciclopiroxolamina, nistatina e anfotericina B.

DROGAS ANTIFÚNGICAS E PROVAS DE SUSCEPTIBILIDADE

Os antifúngicos são drogas que agem de diferentes formas contra os fungos produtores de infecções superficiais, subcutâneas e invasivas, quer sejam como patógenos primários ou oportunistas. Essas substâncias são divididas de acordo com a sua composição química, mecanismos de ação, espectro de ação e tipo de infecção para os quais são dirigidos. O tratamento das micoses, por sua vez, se baseia em múltiplos critérios, incluindo aqueles clínicos, microbiológicos e farmacológicos, sendo o estado imunológico dos pacientes, o tipo de infecção e as características farmacológicas dos antifúngicos os mais relevantes para a tomada de decisão terapêutica. Importa mencionar, contudo, que os agentes antifúngicos podem ser utilizados de quatro maneiras fundamentais: profilática, preemptiva/preventiva, empírica e definitiva (curativa ou terapêutica). O uso profilático é aquele que tem como objetivo prevenir uma infecção em paciente de alto risco. Nesse grupo, estão os transplantados de órgãos e medula óssea e os indivíduos imunocomprometidos de toda ordem. O uso preemptivo é proposto para aqueles pacientes que têm um diagnóstico laboratorial positivo para infecção fúngica, mas ainda não apresentam sintomas clínicos. Para esses, normalmente, os métodos de diagnóstico empregados são aqueles não culturais, como a biologia molecular, sorologia e imagem. O uso empírico dos antifúngicos está estabelecido para aqueles pacientes que têm sinais e sintomas de infecção fúngica, todavia, não têm confirmação laboratorial. Nesta categoria, estão aqueles indivíduos que apresentam febre e neutropenia ou que não respondem à antibioticoterapia. A terapia definitiva é aquela baseada no diagnóstico clínico-laboratorial de infecção, ou seja, utilizada para aqueles que têm uma infecção fúngica provada.

Importa mencionar que os fatores que influenciam a decisão terapêutica incluem: o correto diagnóstico fúngico, combinação da droga de escolha, regime de tratamento, agente causal e síndrome clínica, controle ou correção da medicação de base ou condição de imunocomprometimento, conhecimento do potencial de interação da droga e sua farmacocinética e dos efeitos adversos, prevenção de reações alérgicas, instituição da terapia de manutenção após a terapia primária e o acompanhamento de recaídas depois do tratamento. Como síntese, o sucesso do tratamento antifúngico está baseado, de fato, no rápido diagnóstico e no estado imunológico dos pacientes.

Diversas drogas estão, atualmente, disponíveis para tratamento das infecções fúngicas, no entanto, compostos capazes de eliminar, seletivamente, os agentes fúngicos do organismo humano, com o mínimo de toxicidade, são, ainda, em pequeno número. Os antifúngicos mais utilizados agrupam-se em três grandes famílias: azólicos, poliênicos e candinas. Os azólicos são o grupo mais extenso e se dividem em derivados imidazólicos e triazólicos. Outros fármacos de uso clínico são a 5-fluorocitosina, griseofulvina, terbinafina, amorolfina e ciclopiroxolamina.

Mecanismo de ação das drogas antifúngicas

Amorolfina

Os derivados demetilados das morfolinas são substâncias sintéticas de uso tópico, que apresentam ação fungistática, mas que, em altas concentrações, podem ser fungicidas. Esses compostos inibem a biossíntese do ergosterol por agirem de forma não competitiva e reversível sobre a enzima D-14-redutase (*ERG24*), gerando acúmulo de ignosterol, e sobre a enzima D-7-8 isomerase (*ERG2*), que converte o fecosterol em episterol. Isso leva à formação de membranas celulares defeituosas com alterações importantes na permeabilidade. A amorolfina atua frente as principais espécies de dermatófitos e *Candida*. É usado, preferencialmente, para tratamento das onicomicoses. Não tem boa ação sobre Mucorales, *Aspergillus* sp. e *Fusarium* spp.

Azoles

Os derivados azólicos são compostos sintéticos heterocíclicos que têm em comum um anel azólico contendo nitrogênio. Essas substâncias podem ser divididas em imidazólicos e triazólicos com base no número de nitrogênios encontrados no núcleo azólico. Desse modo, serão classificados como derivados imidazólicos aqueles que apresentam dois nitrogênios em seu anel azólico e como derivados triazólicos os que apresentam três nitrogênios. Essa diferença estrutural resulta em diferentes afinidades de ligação dos azólicos ao sistema enzimático alvo. Na célula fúngica, agem bloqueando a enzima 14-α-demetilase, dependente do citocromo P450 das mitocôndrias, que é codificada pelo gene *erg 11*. A 14-α-demetilase catalisa a demetilação do lanosterol em ergosterol, que é necessário para a síntese de novas membranas citoplasmáticas. Não havendo insumo de ergosterol, a célula fúngica não se replica. O acúmulo de lanosterol parece ser também tóxico para a própria célula, pois altera a disposição dos fosfo-

lipídios e a permeabilidade celular, bem como interfere com a função de enzimas como ATPase, transportadoras de elétrons, citocromo-oxidase, peroxidase e catalase, levando à formação de radicas livres deletérios como peróxidos e superóxidos. Diante desses mecanismos de ação, essas substâncias são consideradas, tipicamente, fungistáticas, no entanto, para alguns fungos, tem se mostrado fungicida (*Aspergillus* sp.). Os derivados azólicos são substâncias que têm amplo espectro, atuando sobre fungos filamentosos, leveduriformes e dimórficos, bactérias, protozoários e helmintos, além de demonstrarem ação imunoestimulante. Na realidade, os azólicos são a maior família de antifúngicos disponíveis para uso clínico, considerados drogas de primeira linha para o tratamento de infecções superficiais e invasivas. Dependendo do tipo de doença fúngica, essas substâncias podem ser empregadas por via tópica, oral e parenteral. Classicamente, os derivados imidazólicos são utilizados de forma tópica no manejo e controle de infecções superficiais. Para tanto, os imidazólicos contam com um grande número de drogas, as quais incluem o clotrimazol, econazol, miconazol, bifonazol, tioconazol, sertaconazol, eberconazol, fenticonazol, isoconazol, oxiconazol, sulconazol, butoconazol, luliconazol, omoconazol e cetoconazol. O miconazol e o cetoconazol, todavia, apresentam também preparações orais, o que estende seus espectros de ação às infecções invasivas. Os derivados triazólicos, por sua vez, têm preponderantemente aplicação sistêmica, sendo empregados no tratamento de infecções invasivas graves que acometem tanto os pacientes imunocompetentes quanto os imunocomprometidos. Atualmente, entre os triazólicos disponíveis, tem-se os de uso tradicional, como o fluconazol e itraconazol, além dos triazólicos de segunda geração que compreendem o voriconazol, posaconazol, ravuconazol, albaconazol, terconazol, pramiconazol, efinaconazol e isavuconazol. Com exceção do efinaconazol e terconazol, que são exclusivamente tópicos, os demais são de uso sistêmico, podendo ser administrados por via oral e/ou parenteral.

Candinas

As candinas são uma família de antifúngicos lipopeptídicos naturais ou semissintéticos, obtidos de diversos fungos e actinomicetos, cujo mecanismo de ação é no nível da parede celular e não no nível da membrana citoplasmática, como ocorre com os derivados azólicos e poliênicos, conferindo, portanto, menor toxicidade, tendo em vista não existir essa estrutura nas células do hospedeiro humano. Na realidade, as candinas geram hepatotoxicidade e nefrotoxicidade mínimas. Essas substâncias têm sito utilizadas para o tratamento de infecções fúngicas superficiais e, principalmente, sistêmicas, estando disponível apenas para aplicação endovenosa. Todos os antifúngicos desse grupo agem inibindo de forma não competitiva a síntese da 1,3-β-D-glucana, que é um dos componentes da parede celular fúngica, o que resulta em instabilidade osmótica, impedindo seu crescimento e reprodução e levando à morte celular. Os dois grupos químicos derivados das candinas são as equinocandinas e a pneumocandinas. As equinocandinas compreendem a anidulafungina, isolada do fungo *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus,* e a micafungina, obtida de *Coleophoma empetri*. As pneumocandinas, sintetizadas a partir do fungo marinho *Glarea lozoyensis* (anteriormente *Zalerion arboricola*), incluem as pneumocandinas A e B e a caspofungina. A ação das candinas depende da concentração da droga, sendo fungicida para *Candida* sp. e fungistática para *Aspergillus* spp. Além disso, demonstram moderada atividade frente ao *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis/Coccidioides posadasii*, *Blastomyces dermatitides*, *Pneumocystis jiroveci* e suas formas císticas, e diversos fungos demáceos. Aqueles fungos onde a 1,3-β-D-glucana está ausente ou sua presença não é relevante, tais como o *Cryptococcus* sp., *Trichosporon* sp., *Rhodotorula* sp., *Fusarium* sp. e fungos da ordem Mucorales, apresentam susceptibilidade diminuída ou resistência à ação dessas substâncias. Os derivados das candinas (anidulafungina) são ativos contra biofilmes, já que a 1,3-β-D-glucana é essencial para a adesão fúngica às superfícies abióticas e celulares.

Ciclopiroxolamina

As hidroxipiridonas são compostos sintéticos tópicos que exibem uma ação fungicida, por sua afinidade a cátions trivalentes, como ferro e alumínio. Essas substâncias são consideradas bloqueadores do início das fases G1/ S do ciclo celular. Acredita-se que a ciclopiroxolamina fixa-se em diferentes organelas, bloqueando o transporte de íons (potássio, fosfato) e aminoácidos nas membranas fúngicas, o que diminui o aporte de substratos essenciais, levando à morte celular. De fato, age quelando íons, o que inibe enzimas fundamentais como os citocromos e interfere com o transporte de elétrons dentro das mitocondriais, diminuindo as reservas energéticas, e, em altas concentrações, inclusive, bloqueia a respiração celular. Adicionalmente, tem efeito antialérgico e anti-inflamatório por inibir a 5-lipooxigenase e a cicloxigenase, necessárias para a síntese de prostaglandinas. Apresenta um amplo espectro, mostrando atividade contra dermatófitos, *Candida* sp., *Cryptococcus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Scopulariopsis brevicaulis*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Phialophora verrucosum* e fungos dimórficos.

5-fluorocitosina

A 5-fluorocitosina é uma pirimidina fluorada sintética que age como antimetabólico e tem sido empregada em associação com o fluconazol e a anfotericina B, para o controle da criptococose e das candidíases. Esse composto atua inibindo a síntese de DNA, RNA e proteínas da célula fúngica, através da conjugação de uma série de enzimas. A 5-fluorocitosina penetra na célula fúngica por meio da enzima citosina permease. Uma vez no interior da célula, a fluorocitosina é desaminada a 5-fluorouracilo, através da enzima citosina desaminase. A 5-fluorouracilo é metabolizada em 5-fluorouridina que, por sua vez, é fosforilada até 5-fluorouridina trifosfato, por ação da uracil ribosiltransferase. A 5-fluorouridina trifosfato é incorporada ao RNA, no lugar da uridina, bloqueando a síntese proteica. Somado a isso, a 5-fluorouracilo também se converte em 5-fluorodesoxiuridina monofosfato que inibe a enzima timidilato sintetase, essencial à síntese de DNA.

A baixa toxicidade para o hospedeiro humano é explicada pela ausência da enzima citosina desaminase. Esse composto é considerado fungistático e fungicida *in vitro*. A 5-fluorocitosina tem pequeno espectro de ação, sendo ativa sobre as leveduras dos gêneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Saccharomyces, Rhodotorula* e alguns fungos filamentosos dos gêneros *Geotrichum*, *Cladosporium* e *Phialophora*. Não tem atividade, contudo, sobre dermatófitos, dimórficos, *Aspergillus* sp. e zigomicetos. Nos fungos sensíveis, é frequente a observação de resistência secundária, quando empregada em monoterapia.

Griseofulvina

A griseofulvina é um antifúngico oral natural, derivado do benzofurano, obtido a partir do *Penicillium griseofulvum*. Essa substância apresenta um espectro reduzido, agindo principalmente sobre dermatófitos e complexo *Sporothrix schenckii*. A griseofulvina penetra nas células por um mecanismo dependente de energia. Como antimicótico, é fungistático, interferindo com a síntese de ácidos nucleicos e replicação do DNA. Durante a mitose, na metáfase, afeta a formação de microtúbulos pela ligação com a α e β-tubulina e outras proteínas celulares, desfazendo o fuso mitótico. Tem afinidade pelas células da pele precursoras de queratina, fixando-se a elas com grande intensidade, de modo que, quando a queratina é formada, a droga permanece unida a essa proteína na pele, nas unhas e no fio de cabelo, tornando-a resistente à invasão e à destruição fúngica. A medida que cresce o novo tecido, esse vai deslocando e eliminando o tecido infectado. Um efeito decorrente é o enroscamento (*curling*) das hifas, o que impede também a adaptação e o parasitismo à queratina humana. Não age, por isso, sobre leveduras. Além de sua ação antifúngica, apresenta uma atividade anti-inflamatória, diminuindo a migração dos polimorfonucleares, o que diminui a resposta imunológica celular e deprime a transformação de linfócitos.

Nicomicinas

As nicomicinas são produtos naturais isolados de *Streptomyces tandae*. Atualmente, se conhecem mais de 20 compostos ativos e os principais representantes desse grupo são as nicomicinas X e Z. Essas substâncias são peptídeos nucleosilados, possuindo um nucleosídeo de pirimidina ligado a um peptídeo. Esses compostos são muito semelhantes à polioxina. Como nas candinas, o alvo celular também é a parede fúngica. O mecanismo de ação está associado à inibição competitiva da enzima quitina-sintetase, envolvida na última etapa de polimerização e formação da quitina. A quitina é um polissacarídeo fundamental para a manutenção da rigidez da parede celular fúngica. A não polimerização da quitina leva à formação de paredes celulares susceptíveis de lise osmótica. Essas substâncias agem mais efetivamente sobre fungos dimórficos e moderadamente sobre *Candida* sp., *Cryptococcus neoformans, Aspergillus* sp. e Mucorales. De forma geral, agem melhor contra fungos filamentosos do que contra leveduras. Além de ação antifúngica, as nicomicinas têm também atividade sobre bactérias e ácaros. As nicomicinas têm mostrado sinergismo com alguns derivados triazólicos.

Polienos

Os derivados poliênicos são antifúngicos produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces*. Como modelo estrutural, os poliênicos contêm 37 átomos de carbono, formando um anel macrocíclico fechado por lactonização. A molécula possui uma cadeia de duplas ligações conjugadas não substituídas (heptaeno), formando um lado hidrofóbico, e uma cadeia poli-hidroxilada com sete grupos hidroxila livres, na porção oposta, formando um lado hidrofílico. Essa estrutura molecular confere aos poliênicos características anfipáticas. Em uma das extremidades da molécula, encontra-se, ainda, um resíduo micosamina (lactona) com um aminogrupo livre, formando uma cadeia lateral. A molécula tem cerca de 24 Å de comprimento, o que equivale a meia camada de fosfolipídio. Os três principais antifúngicos dessa família são a nistatina, a anfotericina B e a natamicina (pimaricina). Essas substâncias ligam-se aos esteróis de membrana, principalmente ao ergosterol, atuando tanto na membrana citoplasmática quanto no sistema endomembranoso. Da união hidrofóbica com o ergosterol, formam-se grandes poros ou canais na membrana e, como consequência, se produzem alterações no intercâmbio iônico, em especial, na bomba de sódio e potássio. Por esses espaços, a célula perde para o exterior íons potássio, modificando o gradiente de prótons, o que leva a um importante transtorno osmótico, determinando lise e morte celular. Além disso, os poliênicos parecem, ainda, apresentar um efeito oxidativo direto sobre a membrana, causando, igualmente, a morte da célula fúngica pela geração de radicais livres tóxicos. Em altas concentrações, essas substâncias inibem a síntese de quitina da parede celular dos fungos. Dependendo da concentração, os derivados poliênicos podem ser fungicidas ou fungistáticos. A afinidade dos poliênicos com o colesterol das células humanas produz uma série de efeitos indesejáveis graves, entre eles, hepato e nefrotoxicidade. O espectro de ação da nistatina e anfotericina B é bastante amplo, incluindo os fungos filamentosos, leveduriformes e dimórficos. Poucas espécies mostram sensibilidade diminuída ou resistência a esse grupo farmacológico, no entanto, fenômenos de resistência são mais frequentes em fungos filamentosos. Como a absorção intestinal e intramuscular é muito reduzida, a administração de poliênicos pode ser feita por via intravenosa, intratecal, intra-articular, tópica, instilações vesicais, líquido de diálise e nebulização. Atualmente, para os poliênicos, existem diversas apresentações farmacológicas com marcadas diferenças farmacocinéticas e graus de toxicidade para os hospedeiros. Disponíveis para uso sistêmico, estão a anfotericina B em sua formulação convencional (desoxicolato), tipicamente nefrotóxica, e as formulações lipídicas, menos tóxicas, como anfotericina B complexo lipídico, anfotericina B lipossomal e anfotericina B de dispersão coloidal. Relativamente à nistatina, por causa sua baixa absorção através da pele e mucosas, esse poliênico

tem sido usado de forma tópica. Devido à sua toxicidade para uso sistêmico, uma nistatina lipossomal foi desenvolvida. A natamicina (pimaricina) tem como indicação principal a queratite micótica.

Sordarinas

Os derivados seminaturais do sodarino (diterpeno glicosídico tetracíclico), obtido de *Graphium putredinis*, tem atividade fungicida sobre fungos filamentosos (*Aspergillus* spp., *Scedosporium boydii*), leveduriformes, como *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., e *Pneumocistis jirovecii*. Essas substâncias agem inibindo, seletivamente, o fator de elongação 2 (FE-2). Os fatores de elongação 1 (EF1) e de elongação 2 (EF2) mediam a translocação do ribossomo ao longo da cadeia polipeptídica para seu alongamento durante a síntese proteica. O fator de elongação 2 é indispensável para a síntese das proteínas da maioria dos fungos e da proteína ribossomal P0. No entanto, algumas espécies têm se mostrado resistente, como *Candida parapsilosis* e *Candida lusitaniae*. Essa droga parece não agir sobre o fator de elongação 2 dos seres humanos.

Terbinafina/Naftifina

Os derivados das alilaminas são drogas sintéticas formadas por dois anéis de benzeno unidos (naftaleno) e uma cadeia lateral insaturada amínica. Essas substâncias são fungistáticas ou fungicidas e inibem, de forma não competitiva e reversível, a síntese de ergosterol da membrana celular, por bloquearem a ação da enzima esqualeno epoxidase, que converte, por epoxidação, o esqualeno em esqualeno 2-,3-epóxido. Essa inibição leva ao acúmulo de esqualeno, que é tóxico para a célula fúngica. Ao mesmo tempo, por isso, não haverá produção de lanosterol e, em consequência, o ergosterol também não será produzido, o que vai gerar, pela privação desse esterol, membranas citoplasmáticas defeituosas. As alilaminas têm atividade, principalmente, sobre dermatófitos, mas agem também frente à *Candida* spp., *Malassezia* spp., *Cryptococcus* spp., *Trichosporon* spp., complexo *Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum*, *Talaromyces marneffei*, *Aspergillus* sp., *Scopulariopsis brevicaulis* e *Fonsecaea pedrosoi*. A formulação tópica parece ser mais eficiente contra candidíases cutâneas e pitiríase versicolor do que a apresentação oral.

Tolnaftato/Tolciclato

Os derivados sintéticos dos tiocarbamatos são de uso tópico e apresentam espectro reduzido. Os dois compostos principais são o tolnaftato e o tolciclato. Em baixas concentrações, essas substâncias são fungistáticas e, em concentrações elevadas, são fungicidas. O mecanismo de ação não é bem compreendido, mas acredita-se que atue, preferencialmente, sobre as membranas externas e internas (retículo endoplasmático), bem como produza degeneração de mitocôndrias e ribossomos. Indícios demonstram que os tiocarbamatos têm atividade sobre a enzima escaleno epoxidase, inibindo, por isso, a síntese de ergosterol. O tolnaftato é ativo frente às principais espécies de dermatófitos, tendo pouca ação sobre leveduras, como *Candida* sp., *Malassezia* sp., e fungos dimórficos. O tociclato, além de agir sobre dos dermatófitos, apresenta certa atividade sobre *Candida albicans* e *Malassezia* spp.

Outros compostos antifúngicos

Diversas substâncias têm sido classicamente utilizadas como drogas antifúngicas. Na realidade, a maioria é de espectro reduzido e tem sido empregada de forma empírica. Muitos desses compostos, de fato, não têm ação antifúngica, mas sim uma ação antisséptica geral. Dentre essas substâncias, podem ser mencionadas o hipoclorito de sódio, ureia, ácido salicílico, ácido undecilênico, sulfato de cobre, permanganato de potássio, azul de metileno, violeta genciana, álcool iodado, povidine e bicarbonato de sódio. O iodeto de potássio tem sido usado no tratamento da esporotricose, bem como na geotricose e aspergilose, por estimular a fagocitose e a quimiotaxia dos neutrófilos (imunoestimulador) e halogenação de proteínas, mediada por peroxidases, formando proteinatos insolúveis. As sulfonamidas também têm sido empregadas para tratamento da paracoccidioidomicose e histoplasmose. As diaminas aromáticas podem apresentar algum efeito sobre histoplasmose e blastomicose norte-americana. A butenafina tem apresentado efeito sobre dermatófitos, fungos dimórficos, *Aspergillus* spp. *Candida* spp. e *Malassezia* spp. A pradimicina tem amplo espectro e age sobre *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Aspergillus* spp.

Mecanismos de resistência às drogas antifúngicas

A resistência a drogas antifúngicas tem sido um dos principais problemas na terapêutica das doenças fúngicas invasivas que acometem pacientes hospitalizados. Nos últimos anos, com o aumento do número de indivíduos imunocomprometidos, tem se observado uma importante elevação nas taxas de incidência de micoses oportunistas como consequência do fato desses pacientes apresentarem diferentes patologias de base, que favorecem o surgimento de intercorrências infecciosas. Concomitantemente, tem sido relatada a ocorrência do fenômeno de seleção de cepas resistentes aos antifúngicos, em função do uso ostensivo desses fármacos, para o controle das infecções fúngicas oportunistas que, com muita frequência, são recidivantes. Na realidade, o imunocomprometimento e a resistência aos antifúngicos são as mais importantes causas de fracasso terapêutico.

Diversos mecanismos de resistência têm sido descritos nos fungos, todavia, esses podem ser classificados em três grandes grupos: 1) modificação do sítio de ação em decorrência de sua superprodução, alteração estrutural ou supressão, 2) modificação da rota metabólica envolvida no mecanismo de ação da droga antifúngica, 3) diminuição da concentração intracelular do antifúngico, tanto por bloqueio de sua entrada quanto por sua retirada ativa da célula. Conceitualmente, a resistência pode ser definida de duas formas, como resistência microbiológica e como resistência clínica. Entretanto, pode haver, ainda, uma composição entre os dois tipos. No

caso da resistência microbiológica, uma cepa é resistente a um antifúngico quando a sua concentração inibitória mínima (CIM) é mais elevada do que a habitualmente verificada para a espécie dessa cepa. Isso quer dizer que o organismo é capaz de crescer *in vitro* na presença de um determinado antifúngico. A resistência microbiológica pode ser classificada de três tipos: intrínseca (inata), primária e secundária (adquirida). A resistência intrínseca é aquela onde todas as cepas de uma mesma espécie apresentam resistência ou insensibilidade (termo preferido por muitos autores para esse tipo de resistência) a um antifúngico. A resistência primária é aquela onde algumas cepas de uma espécie normalmente sensível apresentam resistência (natural) sem ter tido contato prévio com um antifúngico. A resistência secundária é aquela onde cepas previamente sensíveis adquirem resistência, após terem tido contato com um agente antifúngico. Por sua vez, a resistência clínica é um termo utilizado para descrever os casos clínicos cuja infecção persiste ou progride, a despeito de ter sido instituída a terapêutica adequada. Pode ser definida também como aquela que ocorre quando um fungo continua produzindo doença, apesar da concentração da droga antifúngica ser máxima no sítio de infecção. Na verdade, a resistência clínica depende de uma grande quantidade de fatores como a resposta imune do hospedeiro, gravidade da infecção, foco infeccioso (granulomas, abscessos, cateteres, próteses e válvulas), natureza, dose e farmacocinética da droga antifúngica, interações medicamentosas, características dos organismos fúngicos, estabilidade genética da cepa fúngica, tamanho da população do agente fúngico, biofilmes e CIM inicial. De um modo geral, alguns estudos têm observado certa correlação positiva entre a resistência clínica e a obtenção de valores elevados de CIM. Contudo, valores baixos de CIM não garantem o sucesso da resposta clínica, sendo essa dissociação mais evidente em doentes imunocomprometidos.

Azoles

O uso indiscriminado dos derivados azólicos, principalmente o fluconazol, para o tratamento e profilaxia de candidíases orais em indivíduos HIV+ e candidíases vaginais de repetição, determinou o surgimento de resistência secundária em *Candida* spp. Espécies de *Candida* que mostram resistência primária e adquirida ao fluconazol e a outros azoles incluem *Candida glabrata, Candida dubliniensis, Candida norvergensis* e *Candida insconspicua*. Resistência secundária ao fluconazol pode ser observada também em *Crypococcus neoformans*. A resistência intrínseca ao fluconazol tem sido observada em *Candida krusei*. O uso prolongado ou repetido de fluconazol parece aumentar a ocorrência de resistência cruzada com outros azoles. Diversos mecanismos de resistência aos derivados azólicos têm sido descritos, tais como alteração da composição da membrana celular, modificações no sítio enzimático, diminuição da concentração intracelular de azoles e formação de biofilmes. Alterações na composição da membrana plasmática podem afetar a entrada de fármacos na célula fúngica. Essas alterações comprometem a fluidez e produzem assimetrias na membrana, resultando em menor captação dos fármacos. Isolados resistentes ao fluconazol como *Candida albicans*, apresentam mudanças na concentração de fosfolipídios e ácidos graxos, diminuição de ergosterol e um menor coeficiente *fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina*, na membrana celular. Um outro mecanismo de resistência está associado a modificações do sítio enzimático. Mutações pontuais no gene *erg11,* que codifica a enzima 14-α-dimetilase, produz diminuição na afinidade do antifúngico pela enzima. Uma das mutações mais verificadas é a substituição da arginina pela lisina na posição 467. Essas mutações são descritas em isolados de *Candida albicans* e *Candida krusei* resistentes ao fluconazol e levam a reações cruzadas com outros azoles. O aumento na quantidade da enzima 14-α-dimetilase, devido à superexpressão do gene *erg11*, conduz à necessidade de aumento na concentração do derivado azólico para inativar a enzima. Esse tipo de alteração tem sido observada em *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Mutações no gene *erg3* determinam alterações na enzima D-5-6-dessaturase que participa numa etapa anterior à dimetilação do lanosterol. O lanosterol, precursor do ergosterol, é convertido em 14-α-metilfecosterol que, consecutivamente, é catalisada pela D-5-6-dessaturase à 14-α-metilergosta--8,24(28)-dien3,6diol, um esterol intermediário tóxico que inibe o crescimento celular. A inativação da D-5-6-dessaturase impossibilita a produção desse intermediário tóxico, promovendo acúmulo de 14-α-metilfecosterol, que não é tóxico e, por isso, não interfere com crescimento celular fúngico, a despeito da inibição da biossíntese de ergosterol pelos azólicos (fluconazol). Acredita-se, inclusive, que não é a falta de ergosterol que provoca a inibição do desenvolvimento fúngico, mas sim o acúmulo dos intermediários tóxicos. Tem sido observado, ainda, a substituição do ergosterol por derivados do fecosterol na membrana celular dos fungos. Essa modificação, além da resistência ao fluconazol, apresenta reação cruzada com a anfotericina B. Outro mecanismo habitualmente observado, é a diminuição da concentração intracelular de derivados azólicos pela ativação de um sistema de bombas de efluxo, que expulsa para o exterior os fármacos. As duas maiores famílias dessas bombas são os transportadores ABC, codificados pelo gene *cdr*, que determina a expulsão para o exterior de qualquer tipo de derivado azólico, e os facilitadores maiores (MFS), codificados pelo gene *mdr* e que leva à expulsão apenas do fluconazol. Esse sistema ativo de bomba de efluxo pode atuar de forma independente, simultânea ou em sequência. Em *Candida albicans, Candida dubliniensis, Candida glabrata, Aspergillus fumigatus e Cryptococcus neoformans* têm sido descritos esses tipos de mecanismos. A produção de biofilmes é ainda uma outra forma de resistência frente aos azóles e outros antifúngicos, apresentando, como mecanismos, mudanças no estado metabólico e fisiológico das células fúngicas, elevada densidade celular, presença de matriz extracelular, que produz uma barreira fisica que absorve e dificulta a penetração dos azoles, superprodução de um sistema de bombeamento e presença de subpopulações de células persistentes, que podem tolerar altas concentrações de antifúngicos.

Candinas

Apesar de um amplo uso, a resistência às candinas é baixa. Compostos dessa família são ativos frente à *Candida* sp. e *Aspergillus* sp. Contudo, têm atividade limitada frente à *Cryptococcus* sp., *Trichosporon* sp., *Fusarium* sp., *Scedosporium* sp. e zigomicetos. O mecanismo de resistência se baseia em alterações do complexo enzimático que participa da síntese de 1,3-β-glucana da parede celular fúngica. Essas alterações são devido a mutações pontuais nos genes *FKS* e *RHO* que produzem um fenótipo com sensibilidade reduzida às candinas. Alguns isolados fúngicos susceptíveis às candinas são capazes de crescer *in vitro* acima do valor da CIM. Esse comportamento paradoxal tem sido associado a um aumento na síntese de quitina da parede celular, de maneira a compensar a diminuição da 1,3-β-glucana.

5-Fluorocitosina

A prevalência da resistência à 5-fluorocitosina é relativamente baixa, mas quando utilizada em monoterapia, parece haver uma maior tendência ao desenvolvimento de resistência. Dentre os isolados clínicos, *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* têm apresentado menor sensibilidade a esse composto. Basicamente, dois mecanismos de resistência são descritos. Um deles está associado à mutação das enzimas citosina permease e citosina deaminase, codificadas pelos genes *fcy2* e *fcy1*, que levam à diminuição da captação e transformação metabólica do fármaco. O outro mecanismo é a alteração nas enzimas uracil fosforibosil transferase ou da 5-fluoro uracil monofosfato pirofosforilase, responsáveis pela conversão do fármaco em metabólitos com atividade antifúngica. A resistência primária ou intrínseca resulta da diminuição da atividade da citosina permeasse, enquanto a resistência secundária é decorrente das alterações na conversão da fluorocitosina em metabólitos ativos.

Polienos

A resistência aos derivados poliênicos não é comum entre os agentes fúngicos, apesar de mais de 40 anos de utilização no mundo. A causa mais frequente de resistência aos derivados poliênicos é a alteração qualitativa e quantitativa na composição lipídica da membrana citoplasmática, com uma diminuição do conteúdo de ergosterol pela falta da enzima D-7-8-esterol isomerase em função de mutações nos genes *pol1, pol2, pol3* e *pol5*. Além disso, há um acúmulo de esteróis intermediários, como o fecosterol ou o lanosterol devido a mutações nos genes *erg2*, *erg3*, *erg6,* que codificam as enzimas esterol C8-isomerase, C5-dessaturase e C25-metiltransferase, evidenciando uma alteração na via biossintética do ergosterol. Uma diminuição da quantidade de ergosterol e sua substituição por outros esteróis causa uma menor afinidade dos derivados poliênicos pelas membranas fúngicas, limitando os locais de ligação nas células resistentes. As espécies que têm exibido CIM elevada ou resistência incluem, apresentando resistência intrínseca: o *Scopulariopsis* spp. e *Trichosporon* spp. ; apresentando resistência primária: a *Candida lusitaniae*, *Candida rugosa*, *Candida lipolytica*, *Candida krusei* e *Candida guilliermondiie*; apresentando resistência secundária: a *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus lentulus, Aspergillus terreus, Aspergillus ustus* e *Fusarium oxysporum*. A resistência aos derivados poliênicos parece aumentar em isolados fúngicos procedentes de pacientes previa ou concomitantemente tratados com fluconazol. Fatores termodinâmicos também parecem contribuir com a resistência aos derivados poliênicos, pois podem dificultar a união dos poliênicos com o ergosterol. Um exemplo é a variação do conteúdo de 1-3-β-glucano da parede celular fúngica, que estabiliza essa estrutura e influencia na passagem de macromoléculas (poliênicos) até a membrana citoplasmática. A resistência a essas drogas também perece se relacionar com concentrações elevadas de catalase, que diminui a sensibilidade ao dano oxidativo. Importa mencionar que as repercussões clínicas da resistência aos derivados poliênicos é excepcional, porque as mudanças estruturais e metabólicas na célula fúngica são de tal magnitude que acabam por reduzir a taxa de crescimento e virulência das cepas.

Outros antifúngicos

A resistência à terbinafina está associada a mutações no gene *erg1,* que codifica para a enzima esqualeno epoxidase. Em morfolinas, a resistência está relacionada a alterações no gene *erg24,* que codifica para D-14-redutase, e *erg2p*, que codifica para D-8-7-isomerase. Nas sordarinas, os mecanismos de resistência inibem a síntese proteica, bloqueando a função do fator de elongação 2 (EF2) da célula fúngica.

Provas de susceptibilidade às drogas antifúngicas

Normalmente, a resistência aos antifúngicos leva a uma pobre resposta às drogas de uso clínico e a ocorrência de infecções invasivas progressivas, principalmente em pacientes de risco, durante o período de tratamento ou profilaxia. Implicações importantes desse fenômeno estão relacionadas com uma maior taxa de morbidade e mortalidade, dificuldades terapêuticas e mudanças na prevalência das espécies fúngicas. Na rotina, a predição da resistência microbiológica e/ou clínica tem sido realizada através de testes de susceptibilidade *in vitro* de fungos frente aos antimicrobianos. O conhecimento da resistência aos antifúngicos é essencial para a gestão dos fármacos na terapêutica das infecções por esses organismos, pois permite prever a resposta dos pacientes e definir o melhor tratamento ou variar a estratégia de abordagem, aumentando a dose ou alterando o antifúngico ou, ainda, entrando com uma terapia combinada. Na verdade, os testes de susceptibilidade têm indicações precisas, sendo adequados também para os estudos de vigilância epidemiológica, o que permite conhecer os perfis de susceptibilidade ou resistência de cepas clínicas isoladas em uma dada região geográfica, bem como para as cepas que procedam de infecções invasivas ou de pacientes imunocomprometidos, para os casos de fracasso terapêutico, para os pacientes que te-

nham recebido profilaxia antifúngica prévia, para os casos de isolamento de espécies pouco frequentes, cujo espectro de sensibilidade *in vitro* é desconhecido ou que apresentem alta resistência à medicação antifúngica, e para a determinação do nível de resistência frente a novos compostos com atividade antifúngica. Não obstante a utilidade desses testes, tem sido observado que a correlação entre a sensibilidade *in vitro* de um fungo a um determinado antifúngico e a eficácia clínica desse antifúngico no tratamento de uma infecção invasiva, com frequência, é baixa e de difícil estabelecimento. Em função dessa baixa correlação clínica e do pequeno arsenal terapêutico antifúngico, importa mencionar que, diferentemente dos testes de susceptibilidade para bactérias, que são, tipicamente, preditores de sucesso, já que informam, dentre os vários grupos farmacológicos, qual o mais efetivo para uma determinada infecção bacteriana, os testes de susceptibilidade para fungos são, de fato, melhor caracterizados como preditores de fracasso, pois se aplicam mais ao esclarecimento de eventuais intercorrências durante o tratamento do que à proposição do fármaco mais efetivo contra um agente fúngico específico. Assim sendo, esses testes são mais adequados para a utilização no segmento do paciente do que para a execução no momento da cultura fúngica primária. Como preditores de fracasso, os testes de sensibilidade aos antifúngicos permitem determinar se as falhas num tratamento anti-infeccioso são decorrentes de uma resistência microbiológica ou de uma resistência clínica.

Na atualidade, estão disponíveis uma série de sistemas analíticos para a execução de testes de susceptibilidade aos antifúngicos. Dentre esses, dois são considerados métodos padronizados ou estandartizados, podendo ser empregados tanto para a avaliação em fungos filamentosos quanto para a avaliação em fungos leveduriformes. Essas metodologias são o resultado do trabalho de duas entidades internacionais, o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), dos Estados Unidos da América, e o *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST), através de seu *Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing* (AFST), da Comunidade Econômica Europeia, num esforço para tornar a determinação da susceptibilidade reprodutível e concordante intra e interlaboratorialmente. Além dessas metodologias estandardizadas, os estudos da susceptibilidade aos antifúngicos podem ser procedidos a partir de provas comerciais como o Etest (BioMérieux), VITEK 2 (Biomerieux), Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems) e Neo-Sensitabs (Rosco Diagnostika).

Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos podem ser classificados, genericamente, em qualitativos e quantitativos. Os testes qualitativos são representados por métodos denominados difusão em ágar, onde, por exemplo, discos de papel impregnados com uma determinada concentração de antifúngico são depositados sobre um meio de cultura sólido, no qual foi inoculado um fungo. A droga difunde-se pelo meio de cultura, resultando em um círculo concêntrico de inibição de crescimento em torno do disco de papel. O tamanho do halo, ou zona de inibição, depende da susceptibilidade do organismo à droga. O diâmetro desse halo é mensurado em milímetros e o valor encontrado é correlacionado a uma faixa de referência, também em milímetros, associada à sensibilidade ou resistência. Por esse método, é possível a conversão dos resultados dos halos de inibição (expressos em milímetros) em concentração inibitória mínima (CIM) (expressa em μg/mL), cujo conceito está conectado à ideia da menor concentração de um antifúngico capaz de inibir o desenvolvimento visível de um isolado fúngico. Por sua vez, a susceptibilidade quantitativa pode ser avaliada empregando métodos de macro ou microdiluição em caldo. Para o estudo de susceptibilidade em micologia médica, contudo, tem sido empregada a microdiluição em caldo. Nessa metodologia, utiliza-se uma placa de microtitulação de 96 poços, onde são colocadas diferentes concentrações de uma droga antifúngica, em um meio de cultura líquido inoculado com um fungo. A microdiluição permite, igualmente, a determinação de uma CIM, que deverá ser também expressa em μg/mL.

A interpretação dos testes de susceptibilidade aos antifúngicos se fundamenta na análise dos dados de sensibilidade, na detecção dos mecanismos de resistência, na farmacologia do antifúngico (parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos) e nos resultados derivados de sua utilização clínica. Os valores quantitativos obtidos nos estudos de susceptibilidade (halos de inibição e CIM) se traduzem em categorias clínicas qualitativas (sensível, sensível dose-dependente, intermediário e resistente). É importante reiterar que a tradução dos valores quantitativos em qualitativos atendem a critérios microbiológicos, farmacológicos e clínicos estritos, rigorosamente estabelecidos por órgãos internacionais de padronização e harmonização (CLSI e EUCAST), para que possa haver a mais alta reprodutibilidade dos métodos. A diferenciação entre essas categorias clínicas é feita a partir dos chamados pontos de corte clínicos (*Clinical Breakpoints – CBPs*) estandartizados, cuja leitura é baseada nos valores qualitativos de halo de inibição e/ou CIM. Os *CBPs* representam os limites numéricos de cada categoria. Valores acima (ou abaixo) de determinado limite introduzem os fungos numa categoria clínica diferente (sensível, sensível dose-dependente, intermediário e resistente). A probabilidade de êxito ou fracasso terapêutico define essas categorias, como segue:

- **Sensível (S):** o organismo fúngico é inibido *in vitro* por uma concentração do fármaco que pode ser associado à alta probabilidade de sucesso terapêutico;
- **Sensível dose-dependente (SDD):** a sensibilidade é dependente de se alcançar o máximo nível sérico possível;
- **Intermediário (I):** o organismo fúngico é inibido *in vitro* por uma concentração do fármaco que pode ser associado a um efeito terapêutico incerto;
- **Resistente (R):** o organismo fúngico é inibido *in vitro* por uma concentração do fármaco que pode ser associado à alta probabilidade de fracasso terapêutico.

Atualmente, além dos pontos de corte clínicos gerais (*CBPs*), as entidades internacionais de padronização têm propostos novos pontos de corte clínicos espécie-específicos, para alguns complexos fungo-antifúngico, bem como os

chamados pontos de corte epidemiológicos (*Epidemiological Cutoff Values – ECVs/ECOFFs*). Os *ECVs/ECOFFs* são valores que ajudam a separar, numa espécie fúngica específica, as populações sensíveis, que não possuem ou não expressam mecanismos de resistência (tipo selvagem), daquelas resistentes (tipo não selvagem), que possuem e expressam esses mecanismos. É importante registrar que os valores de *CBPs* e os de *ECV/ECOFFs* não são necessariamente coincidentes. A diferença entre esses pontos de corte se assenta na forma como são estabelecidos. Os *CBPs* são definidos com base em avaliações da resposta clínica do paciente e incorporam estudos microbiológicos, farmacocinéticos e farmacodinâmicos do antifúngico, enquanto os *ECV/ECOFFs* derivam apenas de estudos *in vitro* da distribuição das CIM em uma determinada espécie. Diferentemente dos *CBPs*, que permitem a categorização clínica de tratamento dos agentes fúngicos em sensível (tratável) ou resistente (não tratável), os *ECV/ECOFFs* categorizam um isolado em selvagem e não selvagem, denunciando, laboratorialmente, um decréscimo de susceptibilidade do agente fúngico avaliado ou um potencial fenótipo de resistência. Importa reiterar que, apesar de os *ECV/ ECOFFs* não serem adequados como preditores de sucesso ou fracasso terapêutico, eles podem detectar, numa população fúngica, tomando como base o perfil de susceptibilidade natural dessa população, a emergência de resistência, o que pode indicar uma pressão seletiva, com consequências clínicas futuras, pelo uso ostensivo de um dado antifúngico. Na ausência de pontos de corte clínicos, os *ECV/ ECOFFs* podem ser empregados como informes sumários de susceptibilidade, para ajudar a compor, com outros elementos clínicos, uma estratégia de manejo e controle das infecções fúngicas.

Métodos de referência

Atualmente, duas metodologias internacionais estandardizadas (CLSI e EUCAST) para determinação da susceptibilidade de leveduras e fungos filamentosos frente aos antifúngicos de uso clínico estão disponíveis. Essas podem ser baseadas tanto em métodos de microdiluição em caldo, que são quantitativos, quanto em métodos de difusão em ágar, que são qualitativos. O CLSI foi o primeiro organismo internacional a propor a estandardização das metodologias de avaliação de susceptibilidade com o objetivo de garantir a reprodutibilidade inter e intralaboratorial e a confiabilidade dos resultados. Dentre as publicações do CLSI, estão incluídos os seguintes documentos:

- Método de Referência para Teste de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica (M27);
- Método de Referência para Teste de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Fungos Filamentosos à Terapia Antifúngica (M38);
- Método para Teste de Difusão em Disco para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica (M44-A2);
- Método para Teste de Difusão em Disco para a Determinação da Sensibilidade de Fungos Filamentosos Não Dermatófitos à Terapia Antifúngica (M51-A);
- Princípios e Procedimentos para o Desenvolvimento de Valores de Corte Epidemiológicos para Teste de Susceptibilidade a Antifúngicos (M57);
- Valores de Corte Epidemiológicos para Teste de Susceptibilidade a Antifúngicos (M59);
- Normas de Desempenho para Testes de Susceptibilidades a Antifúngicos para Leveduras (M60);
- Normas de Desempenho para Testes de Susceptibilidades a Antifúngicos para Fungos Filamentosos (M61).

Além desses documentos, o CLSI publicou os suplementos M27-S4, M44-S3 e M51-S1 que forneciam tabelas de interpretação dos complexos fungo-antifúngico para os protocolos M27, M44-A2 e M51-A. Recentemente, esses suplementos foram substituídos pelos documentos M60 e M61 que incluem atualizações das tabelas de CIM, diâmetro dos halos de inibição e controle de qualidade, respectivamente, para os documentos M27 e M44, empregados para fungos leveduriformes, e documentos M38 e M51, utilizados para fungos filamentosos.

Os documentos do CLSI (M27, M38, M44-A2 e M51-A) padronizam o preparo do inóculo, os meios de cultura, o pH, os antifúngicos, a concentração dos inóculos, a placa de microtitulação, a temperatura e o tempo de incubação, as leituras das CIM e o controle de qualidade dos testes. A preparação do inóculo deve ser feita pela escala MacFarland (0,5) e método espectrofotométrico. Os meios de cultura propostos são o RPMI 1640, para as provas de diluição em caldo, e ágar Müeller-Hinton, para as provas de difusão em ágar. A faixa de pH compreende valores de 7.0 a 7.4. A concentração do inóculo varia de 10^3 a 10^6 UFC/mL. A temperatura de incubação é de 35 °C, com um tempo de incubação de 16 a 96 horas. A placa de microtitulação deve ter um fundo arredondado. *Candida* sp., *Cryptococcus neoformans*, complexo *Sporothix schenckii* e fungos filamentosos (*Aspergillus* sp., *Altenaria* sp., *Bipolaris* sp., dermatófitos, *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Pseudoallescheria boydii*, *Rhizopus* sp. e outros Mucorales) são os organismos avaliados nesses protocolos. As drogas antifúngicas testadas incluem os azoles (fluconazol, itraconazol, voriconazol, ravuconazol, posaconazol e isavuconazol), anfotericina B, 5-fluorocitosina e candinas (caspofungina, anidulafungina, micafungina). As leituras (visuais) das provas incluem a ausência de turbidez, redução de 80% da turbidez, redução de 50% da turbidez, concentração mínima efetiva (CME) e zona de inibição em milímetros. Pontos de corte também são propostos para alguns antifúngicos (azoles e candinas) frente à *Candida* sp. Para o controle de qualidade e validação das provas são empregadas as cepas ATCC indicadas (*Aspergillus flavus* ATCC 204304, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Paecilomyces variotii* ATCC MYA-3630).

Importa mencionar que, para aquelas combinações fungo-antifúngico cujos *breakpoints* interpretativos não estão disponíveis, o CLSI publicou um protocolo padronizado (M57) com critérios para o desenvolvimento e utilização de valores de corte epidemiológicos para serem empregados como um guia orientativo para a tomada de decisões clínicas, bem como um outro documento (M59) com a definição e a determinação dos pontos de corte epidemiológicos e apresentação de tabelas de controle de qualidade dos ensaios. Com relação aos fungos leveduriformes, foram definidos os pontos de corte epidemiológicos para espécies do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C.guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae, C. parapsilosise C. tropicalis*) frente à anidulafungina, anfotericina B, itraconazol e micafungina. Para os fungos filamentosos, os pontos de corte epidemiológicos foram determinados para membros do gênero *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* e *A. versicolor*) frente à anfotericina B, caspofungina, isavuconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol.

A metodologia estandardizada do EUCAST, por sua vez, é baseada nos métodos de referência do CLSI que empregam a microdiluição em caldo. Para a avaliação das susceptibilidades aos antifúngicos de uso clínico, o EUCAST publicou os documentos:

- Método de Diluição em Caldo para a Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas de Agentes Antifúngicos para Leveduras (E.DEF 7.3.1);
- Método de Diluição em Caldo para a Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas de Agentes Antifúngicos para Fungos Formadores de Conídios (E.DEF 9.3.1).

Ambos os documentos (E.DEF 7.3.1, E.DEF 9.3.1) normatizam o preparo e o tamanho do inóculo, o meio de cultura, o tipo de placa de microtitulação, o formato dos testes, temperatura e tempo de incubação, a leitura das CIM, pontos de corte e o controle de qualidade da reação. Os fungos incluídos nesses documentos são, basicamente, *Candida* sp., *Cryptococcus* sp. e *Aspergillus* sp., testados frente ao fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol, anfotericina B, 5-fluorocitosina, caspofungina, anidulafungina, micafungina. A despeito das metodologias do CLSI e EUCAST terem muitas interfaces de contato, diferem de maneira importante quanto ao tamanho do inóculo, meio de cultura e leitura final. O EUCAST apresenta um inóculo maior (10^5UFC/mL), ajustado a partir da escala MacFarland 0,5 e medido por espectrofotômetro ou ajustado a partir de contagem em hemocitômetro; o meio RPMI 1640 é suplementado com 2% de glicose e a leitura da CIM/CME é visual (inibição completa para anfotericina B e azoles, e crescimento aberrante no ponto final de leitura) ou espectrofotométrica (inibição de 90% para a anfotericina B e de 50% para os azoles e candinas). O tempo de incubação também pode variar, sendo menores (24-48 horas) para o EUCAST. Diferenças também são encontradas nas placas de microtitulação utilizadas, pois as do EUCAST têm um fundo plano, enquanto que as do CLSI têm um fundo redondo. Com relação aos pontos de corte, apesar de exibirem, presentemente, uma maior concordância, a extrapolação entre as metodologias deve ser feita com certa circunspecção. Pontos de corte têm sido estabelecidos para poliênicos, azoles e candinas frente à *Candida* sp. e *Aspergillus* sp. Os fungos empregados no controle de qualidade são cepas ATCC e CNM (Espanha), sendo os organismos propostos a *Candida albicans* CNM-CL F8555, *Candida krusei* ATCC 6258, CNM-CL 3403, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Aspergillus flavus* ATCC 204304, CNM-CM 1813, *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305.

Métodos comerciais

Diversos métodos comerciais estão disponíveis para uso no laboratório clínico, incluindo o E-test (bioMérieux), cuja metodologia se baseia na difusão em ágar, bem como o VITEK 2 (bioMérieux) e o Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems), que empregam a metodologia de microdiluição em caldo. Esses métodos apresentam boa correlação com os métodos de referência preconizados pelo CLSI e EUCAST. Apesar dessa boa concordância, a resistência aos antifúngicos determinada por métodos comerciais deve ser sempre confirmada ou reiterada por um método de referência. Para a obtenção de resultados confiáveis, os métodos comerciais devem ser estritamente procedidos de acordo com as instruções do fabricante, utilizando cepas de controle de qualidade (*Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019), a fim de garantir que todas as CIM fiquem dentro dos valores esperados. O E-Test é um dos métodos mais difundidos em decorrência de sua fácil implementação e leitura nos laboratórios de biodiagnóstico. O método consiste de uma tira de plástico contendo um gradiente de concentração de uma droga antifúngica que permite a determinação da CIM. As tiras são depositadas sobre um meio de cultura sólido, inoculado, previamente, em sua superfície, com um isolado fúngico. Todo o conjunto é incubado à temperatura de 37 °C, por 24-48 horas. O antifúngico contido na tira aplicada sobre o meio de cultura se difunde no ágar, formando uma elipse de inibição. A leitura é procedida após o período de incubação. A determinação da CIM é feita diretamente no ponto de interseção entre a escala contida na tira e a parte final da elipse de inibição do crescimento fúngico. Esse método tem sido empregado para a avaliação da susceptibilidade de fungos leveduriformes e filamentosos frente ao fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, anfotericna B, 5-fluorocitosina e caspofungina. O meio de cultura utilizado nessa prova é o ágar RPMI 1640 suplementado com 2% de glicose. O tempo de incubação pode variar, dependendo da espécie fúngica, sendo de 24-48 horas para *Candida* spp., de 48-72 horas para *Cryptococcus* sp. e de 16 horas ou mais para fungos filamentosos. O 2 é um método automatizado para identificação e teste de susceptibilidade aos antifúngicos, através do crescimento de fungos leveduriformes. O sistema consiste de cartões com 64 poços

contendo alíquotas de fluconazol, voriconazol, anfotericina B e 5-fluorocitosina, numa versão miniaturizada do método de diluição em caldo. Para a realização do teste, é necessário preparar uma suspensão do microrganismo a ser avaliado à escala McFarland 2, em tubos com 3 mL de solução salina. As etapas de inoculação, selagem, incubação e leitura do cartão são executadas pelo próprio aparelho que, por uma análise espectrofotométrica, detecta o poço com bom crescimento da levedura. Os resultados são validados e interpretados por um *software* do sistema de acordo com os pontos de corte clínicos do CLSI, tendo como base os valores de CIM do antifúngico testado. O tempo para liberação dos resultados varia de 9-15 horas para *Candida* sp. e 12 horas para *Cryptococcus neoformans*. Um outro método comercial é o Sensititre YeastOne, que se baseia na metodologia de microdiluição em caldo, mas que apresenta um substrato cromogênico para facilitar a determinação da CIM. As placas de microtitulação contêm um meio de cultura líquido (RPMI 1640 com 1,5% a 2% de glicose), um antifúngico (liofilizado em diluições seriadas – Log_2) e um indicador colorimétrico da reação de oxirredução (corante azul de alamar) em cada poço. Uma suspensão de leveduras (*Candida* sp.) com uma concentração final de 10^3 UFC/mL é requerida como inóculo para a realização dos ensaios. No preparo do teste, 100 µL da suspensão diluente de leveduras devem ser empregados. Recentemente, foram incluídos na biblioteca do método os antifúngicos voriconazol, posaconazol, caspofungina, anidulafungina e micafungina, além daqueles tradicionais como o cetoconazol, fluconazol, itraconazol, anfotericina B e 5-fluorocitosina. O conjunto é incubado a temperatura de 37 °C, por 24-25 horas, para *Candida* spp., e 48-72 horas, para *Cryptococcus neoformans*. A susceptibilidade dos isolados é avaliada a partir do crescimento ou inibição fúngica. Ao se desenvolver no meio, o fungo altera a coloração do indicador de azul para rosa/púrpura. A CIM corresponde à menor concentração do antifúngico que inibiu o crescimento fúngico detectada visualmente através da mudança da cor rosa/púrpura para azul (inibição) na sequência de poços na placa.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

1. Ascioglu S, Rex JH, Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Edwards J E, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA, Walsh TJ. Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patient with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: An International Consensus. Clinical Infectious Diseases 34: 07-14, 2002
2. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. 2ed. USA: Elsevier; 2009. 688p.
3. Arango M, Catañeda E. Micosis Humanas: Procedimientos Diagnosticos – Exámenes Directos. Medellín: CIB; 1995. 195p
4. Arenas R. Micologia Médica Ilustrada. 5 ed. México: McGraw-Hill; 2014. 448p.
5. Arora DR, Arora BB. Medical Mycology New Delhi: CBS Pub & Distrib, 2014. 198p.
6. Bonifaz A. Micologia Básica. 5 ed. México: McGraw-Hill; 2014.726p.
7. Calderone RA, Cihlar RL. Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications. New York: Marcel Dekker Inc.; 2002. 762p.
8. Campbell CK, Johnson EM, Warnock DW. Identification of Pathogenic Fungi. 2ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2013. 335p.
9. Carter GR, Wise DJ. Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology. 6ed. Iowa: Iowa State Press-Blackwell Pub.;2004. 290p.
10. Chandler FW, Kaplan W, Ajello L. Color Atlas and Text of the Histopathology of Mycotic Diseases. England: Wolfe Medical Pub.-Year Book; 1980. 333p.
11. CLSI. Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing. Second Edition. CLSI Supplement M59. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.
12. CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline. CLSI Document M51-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Intitute; 2010.
13. CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - Second Edition. CLSI Document M44-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Intitute; 2009.
14. CLSI. Performance Standards for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Informational Supplement (M51-S1). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Intitute; 2010.
15. CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. First Edition. CLSI Supplement M61. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Intitute; 2017.
16. CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. First Edition. CLSI Supplement M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Intitute; 2017.
17. CLSI. Principles and Procedures for Detection of Fungi in Clinical Specimens – Direct Examination and Culture; Approved Guideline. CLSI Document M54-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Intitute; 2012.
18. CLSI. Principles and Procedures for Development of Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing. First Edition. CLSI Guideline M57. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Intitute; 2016.
19 CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Third Edition. CLSI Standard M38. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Intitute; 2017.
20. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Edition. CLSI Standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Intitute; 2017.
21. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. CLSI Document M27-S4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
22. CLSI. Zone Diameter Interpretative Standards, Corresponding Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Interpretative Breakpoints, and Quality Control Limits for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Third Informational Supplement (M44-S3). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Intitute; 2009.
23. Cruz LCH. Micologia Veterinária. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2010.348p.

24. De Hoog CS, Guarro J, Gené J, Figueiras MJ. Atlas of Clinical Fungi. 2 ed. The Netherlands-Spain: CBS- URV; 2000. 1126p.
25. Delacrétaz J, Grigoriu D, Ducel G. Atlas de Micologia Médica. São Paulo: Manole; 1978. 180p.
26. Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD. Clinical Mycology. Oxford: Oxford University Press; 2003. 519p.
27. Donnelly JP. Symptoms and Diagnosis of Nosocomial Fungal Infections: State-of-The-Arts. European Journal of Medical Research 7: 192-199, 2002.
28. Dugan FM. The Identification of Fungi: An Illustrated Introduction with Keys, Glossary, and Guide to Literature. Minnesota: APS Press; 2008. 176p.
29. Emmons CW. Binford H C. Kwong-Chung KJ. Medical Mycology. 3ed. Philadelphia: Lea & Fibiger; 1977. 592p.
30. Erchiga VC, Florencio VD, García SM. Micología Dermatológica. Málaga: MRA Médica; 2005. 174p.
31. Esposito E. Azevedo JL. Fungos: Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. 2 ed. Caxias do Sul: EDUCS; 2010.637p.
32. EUCAST. Method for the Determination of Broth Dilution Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents for Conidia Forming Moulds. EUCAST Definitive Document (E.DEF 9.3.1). 2017.
33. EUCAST. Method for the Determination of Broth Dilution Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents for Yeasts. EUCAST Definitive Document (E.DEF 7.3.1). 2017.
34. Fisher F, Cook NB. Fundamentals of Diagnostic Mycology. USA: WB Sauders Co.; 1998. 352p.
35. Freitas G, Vaz CP. Micologia Médica. In: Barroso H, Meliço-Silvestre A, Taveira N. Microbiologia Médica. Volume 2. Lisboa: Lidel. 2014. p. 285-394.
36. Howard DH Editor. Fungi Pathogenic for Humans and Animals. Part A: Biology, Part: B: Pathogenicity and Detection I and Part: B: Pathogenicity and Detection II. In Lemke PA Editor: Mycological Series. Volume 3. New York: Marcel Dekker; 1983, 1985.
37. Hungerford LL, Campbell CL, Smith AR. Veterinary Mycology Laboratory Manual. USA: Iowa University Press; 1998.73p.
38. AJello L, Hay RJ. Medical Mycology. In: Collier L, Balows A, Sussman M. Topley & Wilson´s: Microbiology and Microbial Infections. London: Arnold; 1998. 711p.
39. Jugerman PF, Schwartzman RM. Veterinary Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Febiger; 1972. 199p.
40. Kane J, Summerbell R, Sigler L, Krajden S, Land G. Laboratory Handbook of Dermatophytes: A Clinical Guide and Laboratory Manual of Dermatophytes and Other Filamentous Fungi from Skin, Hair, and Nails. USA: Star Pub.; 1997. 344p.
41. Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE Editors. Essentials of Clinical Mycology. 2ed. New York: Springer; 2011. 552p.
42. Kern ME, Blevins KS. Medical Mycology: A Self-Instructional Text. 2 ed. Philadelphia: FA Davis Co.; 1997. 242p.
43. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Medical Mycology. USA: Lea & Febiger; 1992. 866p.
44. Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari, Melo NT. Guia para a Identificação: Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico. São Paulo: Savier; 1998. 445p.
45. Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari, Melo NT. Tratado de Micologia Médica. 9 ed. São Paulo: Savier; 2002. 1104p.
46. Maertens JA, Marr KA. Diagnosis of Fungal Infections. In Cunha BA Series Editor: Infectious Disease and Therapy. New York: Informa; 2007. 406p.
47. Martínez RL, Tovar LJM, Hernández FH, Olivares LRC Micología Médica: Procedimientos para el Diagnóstico de Labratorio. 3 ed. México: Trillas; 2012. 208p.
48. Martins JEC, Melo NT, Heins-Vaccari EM. Atlas de Micologia Médica. São Paulo: Manole; 2005. 170p.
49. McGinnis MR. Laboratory Handbook of Medical Mycology. New York: Academic Press; 1980. 659p.
50. Menezes e Silva CHP, Neufeld PM. Bacteriologia e Micologia para o Laboratório Clínico. Rio de Janeiro: Revinter; 2006. 498p.
51. Mezzari A. Micologia no Laboratório. 2 ed. Porto Alegre: Editora SagraLuzatto; 2001. 139p.
52. Mezzari A, Fuentefria AM. Micologia no Laboratório Clínico. São Paulo: Manole; 2012. 182p.
53. Midgley G, Clayton YM, Hay RJ. Diagnosis in Color Medical Mycology. Chicago: Mosby-Wolfe; 1997. 155p.
54. Minami PS. Micologia: Métodos Laboratoriais de Diagnóstico das Micoses. São Paulo: Manole; 2003. 199p.
55. Moraes AML, Paes RA, Holanda VL. Micologia. Capítulo 4. In Molinaro E, Caputo L, Amendoeira R Orgs.: Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratório de Saúde. Volume 4. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2010. p. 399-496.
56. Neufeld PM. Atlas para Identificação de Fungos de Importância Médica. Rio de Janeiro: PNCQ; 2010. 150p.
57. Neufeld PM. Manual de Micologia Médica: Técnicas Básicas de Diagnóstico. Rio de Janeiro: PNCQ; 1999. 229p.
58. Ng KP, Soo-Hoo TS, Na SL. A Guide to the Study of Basic Medical Mycology. Singapore: Partridge; 2014. 85p.
59. Quindós G. Micología Clínica. Madrid: Elsevier; 2015. 302p.
60. Rebell G, Taplin D. Dermatophytes: Their Recognition and Identification. USA: Miami University Press; 1979. 124p.
61. Reiss E, Shadomy HJ, Lion III GM. Fundamental Medical Mycology. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2012. 623p.
62. Rippon JW. Tratado de Micología Médica. 3. ed. México: McGraw-Hill; 1990. 855p.
63. Samanta I. Veterinary Mycology. New Delhi: Springer; 2015. 177p.
64. Sarosi GA, Davies SF. Doenças Fúngicas do Pulmão. 3 ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2001. 310p.
65. Sidrim JJC, Moreira JLB. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1999. 287p.
66. Sidrim JJC, Rocha MFG. Micologia à Luz de Autores Contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2004. 388p.
67. Silva V, Zaror L. Diagnóstico Micológico en el Laboratorio. Santiago de Chile: Universidad Mayor; 2015. 233p.
68. St-Germain G, Summerbell R. Identifying Fungi: A Clinical Laboratory Handbook. 2 ed. California: Star Pub.; 2011. 378p.
69 Vanbreughem R, de Vroey C, Takashio M. Practical Guide to Medical and Veterinary Mycology. 2 ed. New York: Masson Pub.; 1978. 270p.
70 Vidotto V. Manual de Micologia Médica. Ribeirão Preto: Tecmedd; 2004. 204p. Koneman EW, Roberts GD. Micología: Práctica de Laboratorio. 3 ed. Buenos Aires: Panamericana; 1987. 221p.
71 Wingard JR. Anaissie EJ. Fungal Infections in the Immunocompromised Patient. Boca Raton: Taylor & Francis; 2005. 673p.
72 Zaitz C, Campbell I, Marques AS, Ruiz LRB, Framil VMS. Compêndio de Micologia Médica. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2010.432p.
73 Zaitz C. Atlas de Micologia: Diagnóstico Laboratorial das Micoses Superficiais e Profundas. Rio de Janeiro: Medsi; 1995. 152p.